

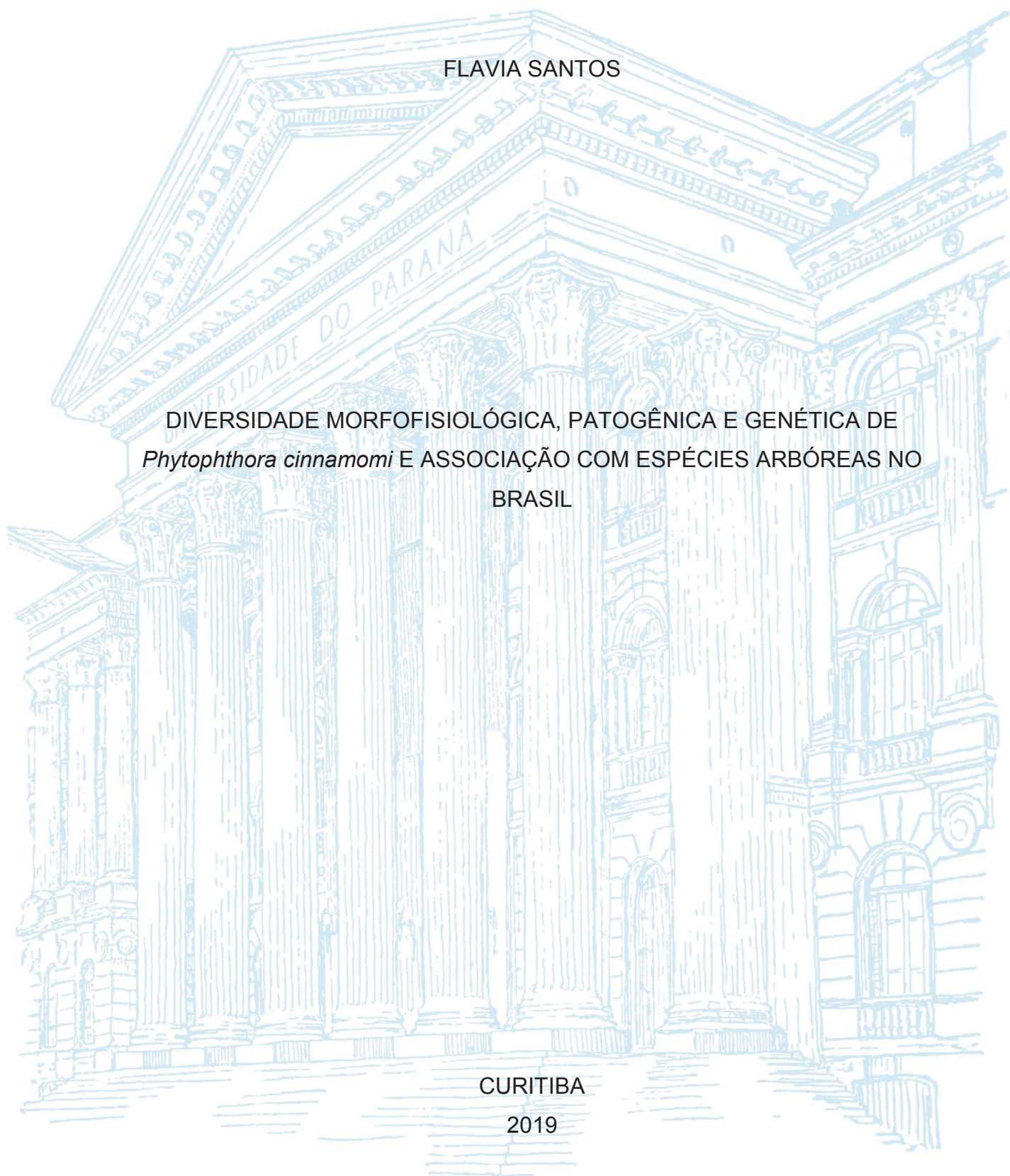
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLAVIA SANTOS

DIVERSIDADE MORFOFISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E GENÉTICA DE  
*Phytophthora cinnamomi* E ASSOCIAÇÃO COM ESPÉCIES ARBÓREAS NO  
BRASIL

CURITIBA

2019



FLAVIA SANTOS

DIVERSIDADE MORFOFISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E GENÉTICA DE  
*Phytophthora cinnamomi* E ASSOCIAÇÃO COM ESPÉCIES ARBÓREAS NO  
BRASIL

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Coorientadores: Prof. Dr. Dauri José Tessmann  
Dra. Elisa Serra Negra Vieira

CURITIBA

2019

Santos, Flavia  
S237d Diversidade morfofisiológica, patogênica e genética de  
Phutophthora cinnamomi e associação com espécies arbóreas no  
Brasil / Flavia Santos. - Curitiba, 2019.  
142 p.: il.,

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia -  
(Produção Vegetal).

Orientador: Álvaro Figueredo Dos Santos

Coorientador: Dauri José Tessmann

Coorientadora: Elisa Serra Negra Vieira

1. Fitopatologia - Brasil - Região Sul. 2. Árvores - doenças e  
pragas. 3. Erva-mate. 4. Araucária. 5. Pinus Taeda. I. Santos,  
Álvaro Figueredo Dos (Orientador). II. Tessmann, Dauri José  
(Coorientador). III. Vieira, Elisa Serra Negra (Coorientadora). IV.  
Título. V. Universidade Federal do Paraná.

CDU 632.4(816)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FLAVIA SANTOS** intitulada: **DIVERSIDADE MORFOFISIOLÓGICA, PATOGENICA E GENÉTICA DE *Phytophthora cinnamomi* E ASSOCIAÇÃO COM ESPÉCIES ARBÓREAS NO BRASIL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Fevereiro de 2019.



ALVARO FIGUEREDO DOS SANTOS  
Presidente da Banca Examinadora



LUCIMERIS RUARO  
Avaliador Externo (UFPR)



DAURI JOSE TESSMANN  
Avaliador Externo (UEM)



ELISA SERRA NEGRA VIEIRA  
Avaliador Externo (EMBRAPA)



CELSO GARCIA AUER  
Avaliador Externo (EF)

Dedico esta tese aos meus pais, Dirceu e Antônia, que sempre me ensinaram que não há riqueza maior que o conhecimento e o estudo. Que não pouparam esforços de suas vidas para me ver realizar meus sonhos, por vezes abdicando de seus próprios.



## AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder saúde, consciência e ciência, por ter me guiado nas horas difíceis e ter colocado as pessoas certas nas horas certas na minha vida.

Aos meus pais, Dirceu e Antônia, por formarem o meu universo, por tudo que são e que me fizeram ser. Por ser meu alicerce, meu farol e meu orgulho. Por me ensinarem o valor do estudo, a inteligência emocional e a ser uma pessoa íntegra. Espero ser o suporte que vocês me deram sempre.

Ao meu orientador Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, que me ensinou a ser cientista, é um exemplo de profissional e uma pessoa fantástica. Sou grata por cada minuto de conversa, cada ensinamento e cada voto de confiança que me foi dado desde a graduação. Agradeço pela paciência, incentivo, amizade e pelas “Phytophthoras”.

Aos meus co-orientadores, Dr. Dauri Tessmann e Dra. Elisa Serra Negra Vieira por aceitarem este papel e pela dedicação em tornar este trabalho melhor.

À Dra. Edna D. M. N. Luz por ceder os 14 isolados de *Phytophthora cinnamomi* da Bahia.

À Embrapa Florestas, principalmente o Laboratório de Patologia Florestal que tem sido minha segunda casa desde a minha graduação, por possibilitar a realização dos meus experimentos em suas dependências. Aos funcionários Caroline e Davi, que são minha segunda família e me ofereceram desde sempre todo apoio necessário, sem hesitar.

Aos meus amigos queridos do Laboratório de Patologia Florestal: Edson, Tiago, Ana, Laísa, A. Carolina, Clodoaldo, Eduardo, João, Cecília, Etienne, Pedro. Obrigada por colorir meus dias quando tudo está cinza, pelo café acompanhado de um afago na alma e pela ajuda nunca negada quando necessária, vocês tornam tudo mais fácil. E aos amigos que não estão na rotina do laboratório e por vezes acabam sentindo a ausência imposta pelo desenvolvimento do trabalho: Heloísa, Nicolle, Cristiane, obrigada por não desistirem dessa pessoa ocupada.

Aos membros da minha banca de qualificação e de pré-defesa, Celso Garcia Auer, Lucimeris Ruaro, Marcos A. Dolinski, pela disponibilidade e pelas contribuições para o aprimoramento da tese.

A todos os professores e funcionários da Pós-Graduação, em especial à Lucimara Antunes que está sempre à disposição para auxiliar e esclarecer as dúvidas dos, por muitas vezes, não tão pacientes pós-graduandos.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

À professora Lucimeris Ruaro, a quem admiro muito, não apenas por ser uma excelente profissional, mas também por ser uma pessoa acessível e muito paciente, pela oportunidade de me permitir realizar a Prática em Docência em sua disciplina.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do Doutorado.

A todos que de alguma maneira direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado e concluído, acreditaram no meu trabalho e torceram pelo meu sucesso.

“Estamos todos conectados; Uns aos outros, biologicamente. A Terra, quimicamente. Ao resto do universo, atomicamente. Existem tantos átomos em uma única molécula de DNA quanto existem estrelas em uma galáxia típica. Somos, cada um de nós, um pequeno universo.” (Neil deGrasse Tyson)



## RESUMO

*Phytophthora cinnamomi* é uma das espécies de patógenos mais devastadores mundialmente conhecidos. O impacto econômico e ambiental causado pelos danos associados a esta espécie, tanto em espécies cultivadas e nativas têm sido relatado em diversos países e em diferentes culturas, sendo necessários estudos constantes sobre suas características e diversidade. No Brasil, esta é uma espécie com poucos estudos, apesar de sua ocorrência já ter sido relatada em diversos cultivos agrícolas e em algumas espécies florestais. Em trabalhos anteriores, foram obtidos e identificados isolados de *P. cinnamomi* de abacateiro e araucária da região Sul do Brasil e da rizosfera de plantas da Mata Atlântica da Bahia. Dessa forma, estima-se que exista uma gama ainda mais ampla de hospedeiros para esta espécie no Brasil, principalmente em espécies florestais. Há ainda, a escassez de informação relacionada às características patogênicas dos isolados conhecidos, uma vez que os estudos conduzidos com esta espécie no Brasil são escassos. Objetivou-se dessa forma, a avaliação da variabilidade de caracteres morfofisiológicos, moleculares e patogênicos, na população de isolados de *P. cinnamomi* provenientes de araucária, abacateiro, rizosfera de Mata Atlântica e plátano para determinar a existência de tipos intraespecíficos; caracterizar e identificar isolados de *Phytophthora* provenientes de árvores de plátano na região sul do Brasil; caracterizar e identificar isolados de *Phytophthora* de outras espécies florestais no Brasil. Para tanto, foi avaliado o crescimento micelial dos isolados em oito temperaturas, formação e dimensões de estruturas sexuais e assexuais e foi realizada a análise molecular com base na região ITS1 e ITS2 e gene COX1 e COX2 do DNA, bem como a análise filogenética. Foi realizado, também, teste de patogenicidade em mudas de araucária e frutos de abacate para avaliação da agressividade dos isolados quantificando-se de incidência e tamanho de lesão, respectivamente. Foi identificada diferença molecular entre isolados de araucária e abacateiro. Existe evidência filogenética de que os isolados AR24, AR49 e AR51 de araucária são diferentes dos outros isolados, bem como os isolados AB22 e AB22A de abacateiro são distintos do restante do grupo. Foram obtidos três novos isolados de *Phytophthora cinnamomi* provenientes de araucária, sendo os primeiros relatados causando doença em mudas, seis novos isolados de abacateiro e quatro isolados provenientes de pinus (*Pinus taeda*). Outros quatro isolados foram obtidos, provenientes de árvores de *Platanus acerifolia*, caracterizando o primeiro relato de *P. cinnamomi* causando doença nesta espécie florestal no Brasil. O primeiro relato da espécie em erva-mate também foi caracterizado, com quatro isolados obtidos, e *P. nicotianae* foi relatado causando a morte de árvores de cedrinho. Este é o primeiro trabalho que trata da diversidade de *P. cinnamomi* no Brasil.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*. Abacateiro. Mata Atlântica. Erva-mate. Diversidade. Etiologia.

## ABSTRACT

*Phytophthora cinnamomi* is one of the world's most devastating pathogen species known. The economic and environmental impact caused by the damages associated with this species, both in agronomic and forest species, has been reported in several countries and in different crops, requiring constant studies on their characteristics and diversity. In Brazil, this is a species with few studies, although its occurrence has been reported in agricultural crops and in some forest species. In previous studies, isolates of *P. cinnamomi* from avocado and araucaria were obtained and identified from the southern region of Brazil and from the rhizosphere of the Atlantic Forest of Bahia. Thus, it is estimated that there is an even wider range of hosts for this species in Brazil, especially in forest species. There is also a scarcity of information related to the pathogenic characteristics of the isolates already known, since the studies conducted with this species in Brazil are scarce. The objective of this study was to evaluate the variability of morphological, molecular and pathogenic characters in the population of *P. cinnamomi* isolates from *Araucaria*, avocado, rhizosphere of plants from Atlantic Forest and platanus to determine the existence of intraspecific types; characterize and identify isolates of *Phytophthora* from platanus trees in southern Brazil; characterize and identify *Phytophthora* isolates from other forest species in Brazil. For this, the mycelial growth of the isolates at eight temperatures, formation and dimensions of sexual and asexual structures was evaluated and the molecular analysis based on the ITS1 and ITS2 region and the COX1 and COX2 gene of the DNA, as well as the phylogenetic analysis of the isolates. A pathogenicity test was also carried out on araucaria and avocado fruits to evaluate the aggressiveness of the isolates, quantifying incidence and lesion size, respectively. A molecular difference was identified between *Araucaria* and avocado isolates. There is phylogenetic evidence that araucaria isolates AR24, AR49 and AR51 are different from the other isolates, and isolates from avocado AB22 and AB22A are distinct from the rest of the group. Three new isolates of *Phytophthora cinnamomi* from araucaria were obtained, being the first report of this pathogen causing disease in seedlings, six new isolates of avocado and four isolates from pinus (*Pinus taeda*). Four other isolates were obtained from *Platanus acerifolia* trees, characterizing the first report of *P. cinnamomi* causing disease in this forest species in Brazil. The first report of the species in yerba mate was also characterized, with four isolates obtained, and *P. nicotianae* was reported causing the death of cypress trees. This is the first study about the diversity of *P. cinnamomi* in Brazil.

Keywords: *Araucaria angustifolia*. Avocado. Atlantic forest. Yerba mate. Diversity. Etiology.

## LISTA DE FIGURAS

### 3 CAPÍTULO I – DIVERSIDADE MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA de *Phytophthora cinnamomi* ASSOCIADOS À ARAUCÁRIA, ABACATEIRO, PLÁTANO E RIZOSFERA

FIGURA 1 – ESTADOS BRASILEIROS DE ORIGEM DOS GRUPOS DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DESTE ESTUDO. ....	46
FIGURA 2 – ASPECTO DAS COLÔNIAS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A (AR21 – PADRÃO COTONOSO), B (AR40 – LIGEIRAMENTE ESTRELADO) E C (AR45 – ROSÁCEO) ISOLADOS DO GRUPO 1 - ARAUCÁRIA; D (AB19 – PADRÃO COTONOSO) E E (AB9 – PADRÃO ROSÁCEO) GRUPO 2 - ABACATEIRO; F (AMOSTRA1B – PADRÃO COTONOSO) GRUPO 3 - PLÁTANO, G (1124 – PADRÃO COTONOSO), H (1335 – PADRÃO ESTRELADO) E I (1336 – PADRÃO ROSÁCEO) GRUPO 4 - RIZOSFERA .....	48
FIGURA 3 – CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DO GRUPO 1 - ARAUCÁRIA EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES.....	50
FIGURA 4 – CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DO GRUPO 2 - ABACATEIRO EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES.....	54
FIGURA 5 – CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DO GRUPO 3 - PLÁTANO EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES.....	57
FIGURA 6 – CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DO GRUPO 4 – RIZOSFERA DE PLANTAS DA MATA ATLÂNTICA EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES... ..	58
FIGURA 7 – CARACTERÍSTICAS DE ESPORÂNGIOS PERSISTENTES E NÃO-PAPILADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A (AR21 – GRUPO1), B (AB21 – GRUPO2), C (-GRUPO3) E D (2383 – GRUPO4). (AUMENTO DE 400X) .....	64

FIGURA 8 –	CARACTERÍSTICAS DE CLAMIDÓSPOROS E DILATAÇÕES DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A (AR-21 – GRUPO 1), B (AB-11 – GRUPO 2), C (Amostra1B – GRUPO 3) – CLAMIDÓSPOROS GLOBOSOS. D (AR-40 – GRUPO 1), E (AB-15 GRUPO 2), F (PlatanoB-GRUPO 3) – DILATAÇÕES ESFÉRICAS.(AUMENTO DE 400X).....	65
FIGURA 9 –	DETALHE DE OÓSPOROS APLERÓTICOS DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A (AR25 - GRUPO1), B (AB22 – GRUPO2), C (AMOSTRA2C – GRUPO3) E D (1149 – GRUPO 4).(AUMENTO DE 400X) .....	66
FIGURA 10 –	ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA UTILIZANDO A REGIÃO ITS PARA UM CONJUNTO REPRESENTATIVO DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DE ARAUCÁRIA. VALORES DE BOOTSTRAP ESTÃO REPRESENTADOS NOS RAMOS. ....	72
FIGURA 11 –	ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA UTILIZANDO A REGIÃO ITS PARA UM CONJUNTO REPRESENTATIVO DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DE ABACATE OS VALORES DE BOOTSTRAP ESTÃO REPRESENTADOS NOS RAMOS. ....	73
FIGURA 12 –	ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA UTILIZANDO A REGIÃO ITS PARA UM CONJUNTO REPRESENTATIVO DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO E RIZOSFERA.....	74
FIGURA 13 –	ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA UTILIZANDO OS GENES COX1 E COX2 PARA UM CONJUNTO REPRESENTATIVO DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO E RIZOSFERA. OS VALORES DE BOOTSTRAP ESTÃO REPRESENTADOS NOS RAMOS.. ....	75
FIGURA 14 –	TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE ARAUCÁRIA. A - MUDA COM SINTOMA DE MURCHA DA PONTEIRA APÓS 21 DIAS, EM B MUDA COM AMARELECIMENTO QUASE TOTAL APÓS 28 DIAS.....	76
FIGURA 15 –	TESTE DE PATOGENICIDADE EM FRUTOS DE ABACATE SETE DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A – TESTEMUNHA, B – AR – 24, C – PLATANO, D – 1175. ....	79

#### 4 CAPÍTULO II - MORTE DE ÁRVORES DE PLÁTANO CAUSADA POR *Phytophthora cinnamomi*

FIGURA 1 –	TESTE DE PATOGENICIDADE COM ISOLADO DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> EM MUDA DE PLÁTANO APÓS 30 DIAS. FOLHA SADIA (A) E FOLHA COM SINTOMA DE AMARELECIMENTO (B) .....	98
FIGURA 2 –	TESTE DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> EM ABACATE QUATRO DIAS APÓS INOCULAÇÃO. FRUTOS INOCULADOS COM LESÃO EM A, B E C; TESTEMUNHA EM D. ....	99
FIGURA 3 –	CRESCIMENTO MICELIAL (MM) DE QUATRO ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> sp. DE PLÁTANO (ISOLADO 2A, ISOLADO 2C, ISOLADO 1B E ISOLADO PB) E DE <i>P. cinnamomi</i> DE ARAUCÁRIA (ISOLADOS AR-21, AR-32, AR-40 E AR-51).....	100
FIGURA 4 –	ASPECTO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> . DE PLÁTANO. A – ISOLADO 1B; B- ISOLADO 2C; C- ISOLADO 2A E D- ISOLADO PB. ....	100
FIGURA 5 –	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> (AUMENTO DE 400X). A– DILATAÇÕES (ISOLADO 2A); B,C (ISOLADO PB, ISOLADO 1B – CLAMIDÓSPOROS TERMINAIS; D,E,F (ISOLADO 2C, ISOLADO 2A, ISOLADO 1B) – ESPORÂNGIOS ELIPSOIDES; G,H,I (ISOLADO 2C, , ISOLADO PB, ISOLADO 1B ) – OÓSPOROS GLOBOSOS COM ANTERÍDIOS ANFÍGENOS. ....	101

#### 5 CAPÍTULO III – PATOGENICIDADE DE *Phytophthora cinnamomi* E *P. nicotinae* À ARAUCÁRIA, ERVA-MATE, PINUS E CEDRINHO

FIGURA 1 –	MORFOLOGIA DAS CULTURAS DE <i>Phytophthora</i> sp. DE ERVA MATE (A), ARAUCÁRIA (B), PÍNUS (C) E CEDRINHO (D) A 24 °C COM SETE DIAS DE CULTIVO EM MEIO V8-ÁGAR: (A – 32B) PADRÃO ROSÁCEO, (B – AM35, C – 7, D - Ced) PADRÃO COTONOSO. ....	118
FIGURA 2 –	CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> sp. DE ERVA MATE (31A, 31B, 32A, 32B),	

	ARAUCÁRIA (AM34, AM35, AM36) PINUS (7, 7A, 7B, 7C) E CEDRINHO (Ced), EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.....	119
FIGURA 3 –	CARACTERÍSTICAS DE ESPORÂNGIOS E CLAMIDÓSPOROS DE <i>Phytophthora</i> spp. SOB AUMENTO DE 400X. ESPORÂNGIOS ELIPSOIDES, PERSISTENTES E NÃO-PAPILADOS. A – AM35 (ARAUCÁRIA), B – 31B (ERVA-MATE), C – 7C (PÍNUS), D – CED (CEDRINHO); CLAMIDÓSPOROS TERMINAIS. C – 31A (ERVA-MATE), D – AM36 (ARAUCÁRIA).....	123
FIGURA 4 –	OÓSPOROS DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> sp.: OÓSPORO APLERÓTICO E ANTERÍDIO ANFÍGENO. (A: ISOLADO DE PINUS-7A, B: ISOLADO DE ERVA MATE – 32A, C: ISOLADO DE PINUS – 7B, D: ISOLADO DE ARAUCÁRIA - AM34).....	124



## LISTA DE TABELAS

### 3 CAPÍTULO I – DIVERSIDADE MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICA de *Phytophthora cinnamomi* ASSOCIADOS À ARAUCÁRIA, ABACATEIRO, PLÁTANO E RIZOSFERA

TABELA 1 –	ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> UTILIZADOS NESTE TRABALHO E PROCEDÊNCIA.....	47
TABELA 2 –	RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS CULTURAIS E TEMPERATURA DE CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO, RIZOSFERA E DE DESCRIÇÕES ANTERIORES.....	49
TABELA 3 –	DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS ASSEXUADAS DOS ISOLADOS <i>Phytophthora cinnamomi</i> DOS GRUPOS 1, 2,3 E 4...	61
TABELA 4 –	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS ESTRUTURAS ASSEXUADAS DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO, RIZOSFERA E DA LITERATURA.....	64
TABELA 5 –	DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS SEXUADAS DOS ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DOS GRUPOS 1,2,3 E 4.....	67
TABELA 6 –	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS ESTRUTURAS SEXUADAS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO, RIZOSFERA DO BRASIL PAREADOS COM <i>P. frigida</i> E DA LITERATURA.....	70
TABELA 7 –	SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DE ARAUCÁRIA, ABACATEIRO, PLÁTANO E RIZOSFERA MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DE PORÇÕES E DAS REGIÕES ITS1, ITS2 E DO GENE COX DO DNA RIBOSSOMAL COM SEQUÊNCIAS DO <i>Phytophthora</i> -ID....	71
TABELA 8 –	INCIDÊNCIA (%) DE PLANTAS MORTAS DE ARAUCÁRIA APÓS 91 DIAS DE INOCULAÇÃO de <i>Phytophthora cinnamomi</i> . ....	77
TABELA 9 –	INCIDÊNCIA DE MUDAS MORTAS DE ARAUCÁRIA MORTAS APÓS INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DOS QUATRO GRUPOS DE HOSPEDEIROS .....	78

TABELA 10 –	ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> AGRUPADOS EM RELAÇÃO AO TAMANHO DA LESÃO EM FRUTOS DE ABACATE SETE DIAS APÓS INOCULAÇÃO.....	80
-------------	--	----

TABELA 11 –	ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DOS QUATRO GRUPOS DE HOSPEDEIROS AGRUPADOS POR TESTE DE SCOTT-KNOTT EM RELAÇÃO AO TAMANHO DA LESÃO EM FRUTOS DE ABACATE 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO .....	81
-------------	--	----

#### **4 CAPÍTULO II - MORTE DE ÁRVORES DE PLÁTANO CAUSADA POR *Phytophthora cinnamomi***

TABELA 1 –	DIMENSÕES DOS ESPORÂNGIOS, CLAMIDÓSPOROS E OÓSPOROS DOS ISOLADOS DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> DE PLÁTANO E DE <i>P. cinnamomi</i> DE ARAUCÁRIA (ISOLADOS AR-21, AR-32, AR-40 E AR-51).....	102
------------	--	-----

#### **5 CAPÍTULO III – PATOGENICIDADE DE *Phytophthora cinnamomi* E *P. nicotianae* À ARAUCÁRIA, ERVA-MATE, PINUS E CEDRINHO**

TABELA 1 –	CARACTERÍSTICAS CULTURAIS, DE ESPORÂNGIOS E CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> spp. DE ERVA MATE, ARAUCÁRIA, PINUS E CEDRINHO EM MEIO DE CULTURA V8-ÁGAR .....	117
------------	---	-----

TABELA 2 –	DIMENSÕES DOS ESPORÂNGIOS E CLAMIDÓSPOROS DE <i>Phytophthora</i> spp. DE ERVA MATE, ARAUCÁRIA, PÍNUS E CEDRINHO EM EXTRATO DE SOLO.....	121
------------	---	-----

TABELA 3 –	GRUPO DE COMPATIBILIDADE, DIMENSÕES DO OOGÔNIO E OÓSPORO DOS ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> spp. ....	125
------------	--	-----

TABELA 4 –	SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> spp. DE ERVA MATE, ARAUCÁRIA, PINUS E CEDRINHO MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DE PORÇÕES E DAS REGIÕES ITS1, ITS2 E DO GENE COX DO DNA RIBOSSOMAL COM SEQUÊNCIAS DO <i>Phytophthora</i> -ID.....	126
------------	--	-----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1 <i>Phytophthora</i> : O GÊNERO E ASSOCIAÇÃO COM ESPÉCIES FLORESTAIS ..	21
2.2 <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	23
2.2.1 Descrição, biologia e ciclo de vida .....	23
2.2.2 Doenças e impactos em espécies florestais.....	24
2.3 ESTUDOS DE VARIABILIDADE DE ESPÉCIES DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> ..	26
2.4 REFERÊNCIAS.....	28
<b>3 CAPÍTULO I – VARIABILIDADE MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICA DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> ASSOCIADA À ESPÉCIES ARBÓREAS E RIZOSFERA.....</b>	<b>37</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	39
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.2.1 Origem dos isolados.....	40
3.2.2 Caracterização morfofisiológica .....	41
3.2.2.1 Aspecto das colônias.....	41
3.2.2.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial .....	42
3.2.2.3 Produção e avaliação de estruturas assexuadas .....	42
3.2.2.4 Produção e avaliação de estruturas sexuadas .....	43
3.2.3 Caracterização molecular.....	43
3.2.4 Análise filogenética .....	44
3.2.5 Caracterização patogênica.....	44
3.3 RESULTADOS .....	46
3.3.1 Caracterização morfofisiológica .....	46
3.3.2 Caracterização molecular.....	70
3.3.3 Análise Filogenética .....	72
3.3.4 Caracterização patogênica.....	76
3.4 DISCUSSÃO .....	83
3.5 CONCLUSÕES .....	87
3.6 REFERÊNCIAS.....	88
<b>4 CAPÍTULO II - MORTE DE ÁRVORES DE PLÁTANO CAUSADA POR <i>Phytophthora cinnamomi</i>.....</b>	<b>91</b>

4.1 INTRODUÇÃO .....	93
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	94
4.2.1 Isolamento.....	94
4.2.2 Teste de Patogenicidade.....	95
4.2.3 Crescimento micelial e aspecto das colônias .....	95
4.2.4 Características morfológicas das estruturas sexuais e assexuais .....	96
4.2.5 Caracterização molecular.....	97
4.3 RESULTADOS .....	98
4.4 DISCUSSÃO .....	103
4.5 CONCLUSÕES .....	105
4.6 REFERÊNCIAS.....	105
<b>5 CAPÍTULO III – PATOGENICIDADE DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> E <i>P. nicotianae</i> EM ARAUCÁRIA, ERVA-MATE, CEDRINHO E RIZOSFERA DE ÁRVORES DE PINUS .....</b>	<b>108</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	110
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	112
5.2.1 Origem dos isolados.....	112
5.2.2 Teste de patogenicidade .....	112
5.2.3 Caracterização morfofisiológica .....	113
5.2.3.1 Aspecto das colônias.....	113
5.2.3.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial .....	113
5.2.3.3 Avaliação de estruturas assexuais .....	114
5.2.3.4 Avaliação de estruturas sexuais .....	114
5.2.4 Caracterização molecular.....	115
5.3 RESULTADOS .....	116
5.3.1 Isolados e teste de patogenicidade .....	116
5.3.2 Caracterização morfofisiológica .....	116
5.3.2.1 Avaliação das estruturas sexuais .....	123
5.4 DISCUSSÃO .....	126
5.5 CONCLUSÕES .....	130
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>131</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Phytophthora*, descrito por Anton de Bary em 1876 e por ele denominado “destruidor de plantas”, de forma assertiva e ainda atual apesar dos 142 anos passados desde sua descrição, é um dos fitopatógenos mais destrutivos, causando grandes impactos em ecossistemas nativos, florestas e plantios agrícolas (ERWIN; RIBEIRO, 1996; HANSEN; REESER; SUTTON, 2012). Este gênero está distribuído geograficamente em todas as regiões do mundo e engloba espécies em sua maioria fitopatogênicas (ERSÉK; RIBEIRO, 2010). A maioria das espécies de *Phytophthora* infecta o sistema radicular das plantas e podem sobreviver no solo sem a presença do hospedeiro, por meio de clamidósporos e oósporos (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Dentre as espécies relatadas *Phytophthora cinnamomi* Rands destaca-se por seu histórico e pelas doenças causadas. Foi isolada pela primeira vez em 1922 em Sumatra, Ásia, e foi disseminada por meio de solo e plantas doentes em navios através da exploração extrativista de plantas (CRANDALL; GRAVATT, 1967; ZENTMYER 1980; ERWIN; RIBEIRO, 1996; ROBIN; SMITH; HANSEN, 2012). *Phytophthora cinnamomi* é um dos patógenos de plantas mais devastadores do mundo, dados os impactos causados tanto em ambientes nativos como em ambientes cultivados (BURGESS et al., 2017). Zentmyer (1980) reportou cerca de 900 hospedeiros para a espécie. Atualmente, o patógeno está distribuído mundialmente e sua gama de hospedeiros é de cerca de 5000 espécies (CAHILL et al., 2008; JUNG; COLQUHOUN; HARDY, 2013).

Em adição às perdas econômicas substanciais na agricultura, a introdução inadvertida de *P. cinnamomi* teve consequências desastrosas para ecossistemas nativos e para a biodiversidade. Exemplos incluem o impacto de *P. cinnamomi* em florestas de castanheiro e de carvalho na Europa (SGHAIER-HAMMAMI et al., 2013; SERRAZINA et al., 2015), abacateiro mundialmente e macadâmia (REEKSTING; OLIVIER; VANDENBERG, 2016; AKINSANMI et al., 2017) e na vegetação nativa no sudeste e sudoeste da Austrália (CAHILL et al., 2008; JUNG; COLQUHOUN; HARDY, 2013). Cerca de 4000 espécies nativas são suscetíveis nas florestas da Austrália Ocidental onde *P. cinnamomi* é o agente causal do denominado “dieback” dos eucaliptos (*Eucalyptus marginata* Donn. Ex Sm.) (WESTE, 2003; SHEARER; CRANE; COCHRANE, 2004).

Desde os estudos realizados por de Bary, em 1876, mais de 100 espécies de *Phytophthora* foram descritas (KROON et al., 2012). Sob a luz destas descobertas é essencial o entendimento das variações intraespecíficas que possam fornecer informações relevantes para a descrição de uma nova espécie. A caracterização de uma população de *P. cinnamomi* deve incluir o estudo da variabilidade morfológica, fisiológica, bem como a variabilidade molecular. Neste sentido, o gênero *Phytophthora* possui diversas características que são úteis na descrição fenotípica, como tradicionalmente se tem utilizado a morfologia e dimensões do esporângio, crescimento micelial em diferentes temperaturas, estudo dos tipos de compatibilidade e características do oósporos e anterídios (WATERHOUSE, 1963; ERWIN; LIYANAGE; WHEELER, 1989; RIBEIRO, 1996), utilizados na distinção de espécies. No entanto, pode ocorrer certo grau de variabilidade dentro da mesma espécie (BRITT; HANSON, 2009).

Diversos marcadores genéticos e metodologias têm sido empregados na tentativa de entender a variabilidade de *P. cinnamomi* incluindo insoenzimas, RAPD, AFLP, microssatélites, haplótipos mitocondriais e sequenciamento genético direto (GREENE; BENSON; IVORS, 2006; MARTIN; COFFEY, 2012). Diversos primers foram desenvolvidos para espécies de *Phytophthora* para amplificar genes nucleares e mitocondriais e uma das regiões mais informativas é a ITS (internal transcribed spacer). Essa região tem sido utilizada para construir relações filogenéticas no gênero e como marcadora para identificação de espécies, bem como para inferir sobre variabilidade intraespecífica (COOKE et al., 2000; KROON et al., 2004; VILLA et al. 2006; BLAIR et al., 2008). Regiões complementares podem ser sequenciadas com o objetivo de se construir árvores filogenéticas como, por exemplo:  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub) e a citocromo oxidase subunidades 1 e 2 (COX1, COX2) (SCHREIER, 2013).

No Brasil, estudos mais aprofundados relacionados a *P. cinnamomi* são escassos, apesar da presença deste patógeno em diferentes regiões, sendo mais comum novos relatos, aumentando assim a lista de hospedeiros nacionalmente. Santos et al. (2014) apresentam uma lista de hospedeiros incluindo famílias, gêneros e espécies. Relatos incluem plantas das famílias Alliaceae (cebola), Bromeliaceae, (abacaxi), Myrtaceae (eucalipto), Passifloraceae (maracujá), Pinaceae (pinus), Rutaceae (citros) e na rizosfera de plantas endêmicas da Mata Atlântica (*Parinari alvimii*; *Manikara maxima*; *Harleyodendron unifoliatum*) (MAGALHÃES, 2009; LUZ et al., 2001). O patógeno também foi relatado em solo da



rizosfera de helicônia (*Heliconia bihai* L.), bastão do imperador (*Etlingera elatior*), cebolinha (*Allium fistulosum* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.) na região Sul da Bahia (SANTOS et al., 2014). Estudos recentes incluem *P. cinnamomi* como o agente causal da podridão radicular do abacateiro (*Persea americana* Mill.) na região sul do Brasil e associado à morte de árvores de araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntz), uma conífera nativa da região sul do Brasil que se encontra em risco de extinção devido à sua intensa exploração nas últimas décadas (SANTOS et al., 2011).

Em trabalhos prévios, isolados de *P. cinnamomi* de diferentes hospedeiros e diferentes regiões brasileiras foram obtidos e identificados, e dada à escassez de informações sobre a espécie no Brasil, verificou-se a necessidade de um estudo sobre a diversidade morfológica, fisiológica, molecular e patogênica deste patógeno. Neste período, verificou-se também a morte de árvores de plátano (*Platanus acerifolia* (Aiton) Willd.) e erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.), na região Sul do Brasil e a sua associação com *Phytophthora*, demandando a necessidade de se identificar o agente causal da doença.

Apesar do impacto mundial causado por *P. cinnamomi*, o entendimento sobre variabilidade fenotípica e genotípica das populações brasileiras deste patógeno ainda é limitado. No entanto, para se manejar e controlar com sucesso as doenças causadas por este patógeno é essencial saber o quanto de variabilidade fenotípica e genotípica existe em uma população (ANDERSON, 2005; MCDONALD; LINDE, 2002). São necessários também estudos que possam confirmar a presença do patógeno e sua associação com prováveis hospedeiros, bem como a caracterização dos patógenos isolados.

Com base no exposto acima, este trabalho foi organizado em três capítulos que apresentam os seguintes objetivos: Capítulo I - avaliar a variabilidade de caracteres morfofisiológicos, moleculares e patogênicos, na população de isolados de *P. cinnamomi* provenientes de araucária, abacateiro, rizosfera de Mata Atlântica e plátano para determinar a existência de tipos intraespecíficos; Capítulo II - caracterizar e identificar isolados de *Phytophthora* provenientes de árvores de plátano na região sul do Brasil; Capítulo III - caracterizar e identificar isolados de *Phytophthora* de outras espécies florestais no Brasil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Phytophthora*: O GÊNERO E ASSOCIAÇÃO COM ESPÉCIES FLORESTAIS

O gênero *Phytophthora* pertence ao Reino Straminipila, filo Oomycota, Família Peronosporales (MYCOBANK, 2019), diferenciando-se dos fungos verdadeiros por obterem as principais características: a maior parte do seu ciclo de vida é diploide, paredes celulares compostas por celulose e  $\beta$ -glucanos em vez de quitina, produção de zoósporos biflagelados e não sintetizar esteróis (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Embora os oomicetos compartilhem muitas características morfológicas em comum com os fungos verdadeiros, são evolutivamente mais relacionados às algas marrons e às plantas (BALDAULF; PALMER, 1993; MARTIN; TOOLEY, 2003). As espécies de *Phytophthora* produzem estruturas assexuadas e sexuadas. A reprodução assexuada é alcançada pela formação de clamidósporos e esporângios. Clamidósporos são estruturas de resistência esféricas, de parede espessa, capazes de persistir no solo ou no tecido da planta por anos (HWANG; KO, 1978). O esporângio emerge diretamente das hifas através de estruturas conhecidas como esporangióforos, os quais, sob condições ótimas de temperatura e umidade, liberam os zoósporos biflagelados (KAMOUN, 2000). Os esporângios têm a capacidade de poder germinar diretamente como micélio ou emitir zoósporos móveis, que já saem formados, e esta habilidade proporciona às espécies de *Phytophthora* a capacidade de causar doenças epidemiologicamente mais explosivas sob condições ambientais apropriadas (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

A reprodução sexuada das espécies de *Phytophthora* ocorre pela junção do anterídio, gametângio masculino, e o oogônio, gametângio feminino, que dão origem ao oósporo (SMITH, 2007). Algumas espécies são capazes de produzir o oósporo em cultura de um mesmo isolado, sendo chamadas homotáticas, enquanto outras são heterotáticas e requerem a presença de dois isolados com tipos de compatibilidade opostos (KAMOUN, 2000). As espécies heterotáticas são divididas em dois tipos de compatibilidade: A1 e A2 (ERWIN; RIBEIRO, 1996; SCHUMANN; D'ARCY, 2006).

As espécies de *Phytophthora* são disseminadas através de tecido de hospedeiro infectado, solo e água (ERWIN; RIBEIRO, 1996). O progresso da doença é favorecido em situações onde o solo é mal drenado e na ausência de medidas de

sanidade. Reutilização de água de irrigação também pode agravar a doença em viveiro uma vez que o inóculo pode ficar retido nos reservatórios (REEVES, 1975).

O gênero *Phytophthora* contém inúmeros patógenos de plantas de importância histórica e ecológica – desde *P. infestans* que devastou os batatais na Irlanda, causando fome e emigração, até *Phytophthora cinnamomi*, responsável pelo “dieback” em florestas na Austrália (DELL; MALAJCZUK, 1989; ERWIN; RIBEIRO, 1996; NOWICKI et al, 2012). As espécies de *Phytophthora* são mundialmente distribuídas, abundantes e muito diversas em ecossistemas além da agricultura. *Phytophthora* é tradicionalmente considerado um microorganismo de solo, e os solos de florestas abrigam uma diversidade de espécies (HANSEN, 2012). Levantamentos realizados em amostras de solo de florestas de carvalho em diferentes países na Europa e nos Estados Unidos identificaram a presença de espécies de *Phytophthora* em 21 a 69% das amostras, onde 17 espécies foram identificadas no total, sendo as mais frequentes em ordem: *P. quercina*, *P. citricola*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi* e *P. gonapodyides* (JUNG; BLASCHKE; NEUMANN, 1996; HANSEN; DELATOUR, 1999, JUNG et al., 2002; VETTRAINO et al., 2002; JÖNSSON et al, 2003; BALCI; HALMSCHLAGER, 2003; BALCI et al., 2007).

Na Austrália Ocidental, a coleção de *Phytophthora* acumulada durante 30 anos originada de levantamentos florestais originalmente tendo como alvo *P. cinnamomi* foi reexaminada em 2009 (BURGESS et al., 2009). Das 19 espécies presentes na coleção, que foram identificadas de amostras coletadas e isoladas por meio de iscas de solo e raízes de diversas espécies nativas, apenas cinco espécies foram reconhecidas antes do ano 2000 e apenas quatro das 19 foram encontradas também em coleções da Europa e América do Norte (HANSEN, 2012).

Dentre os hospedeiros de uma ou mais espécies de *Phytophthora* estão espécies florestais como carvalho (*Quercus* sp.), pinheiro (*Pinus* sp.), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), as plantas cítricas (*Citrus* spp.), o cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), a seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg) e cultivos anuais como o mamoeiro (*Carica papaya* L.), a batata-inglesa (*Solanum tuberosum* L.) e o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) (SANTOS; LUZ; REIS, 2014). No Chile, em meados da primeira década de 2000, foi relatada uma nova doença em uma espécie de pinheiro (*Pinus radiata* D. Don), denominada dano foliar do pinheiro, que tem se disseminado rapidamente ameaçando esta espécie. Em 2008 foi descoberto o agente etiológico da doença e descrita uma nova

espécie *Phytophthora pinifolia* (DURÁN et al., 2008). No Brasil a primeira espécie de *Phytophthora* relatada foi *P. infestans*, em batata, em 1898, e segundo levantamento realizado em 2001 por Luz e Matsuoka, 18 espécies de *Phytophthora* foram relatadas no Brasil, ocorrendo em 74 espécies vegetais hospedeiras. Em 2005, um levantamento suplementar ampliou esse número para 22 espécies, com quatro novas espécies válidas relatadas (LUZ, 2006).

## 2.2 *Phytophthora cinnamomi*

### 2.2.1 Descrição, biologia e ciclo de vida

*Phytophthora cinnamomi* está na lista dos dez oomicetos patógenos de plantas de maior importância baseado em sua relevância científica e econômica (KAMOUN et al., 2015). Esta espécie foi descrita por Rands em 1922 causando doença em árvores de canela na Sumatra (SHEPHERD, 1975; OLD; MORAN; BELL, 1984; LINDE; DRENT; WINGFIELD, 1999), e atualmente apresenta uma distribuição mundial (PRATT; HEATHER, 1973).

*Phytophthora cinnamomi* é um patógeno de solo com ambas as fases sexuada e assexuada em seu ciclo de vida (ZENTMYER, 1980). Os oósporos sexuais, clamidósporos assexuais e os agregados de hifas possibilitam ao patógeno sua sobrevivência por longos períodos sob condições adversas e faz com que a erradicação completa do patógeno, seja extremamente difícil (JUNG et al., 2013). Os esporângios, assexuais, são produzidos em condições favoráveis e, quando maduros, liberam os zoósporos. Os zoósporos podem se locomover por curtas distâncias e são atraídos por sinais químicos das raízes em crescimento do hospedeiro. Quando em contato com a raiz, perde o flagelo e infecta a planta por meio de tubo germinativo e uma vez dentro da raiz o tubo germinativo forma micélio matando as raízes conforme isso ocorre. O patógeno infecta tipicamente as raízes do hospedeiro, podendo também penetrar o lenho por meio de ferimento ou aberturas naturais na camada epidérmica das plantas (O'GARA et al., 2015). A sua colonização nas raízes causa a podridão e interfere na absorção e transporte de água que resulta na murcha e na clorose das folhas. A planta pode morrer logo após a infecção pelo patógeno ou ainda sobreviver, sem apresentar os sintomas da doença por muitos anos (HARDHAM, 2012).

As hifas dessa espécie ramificam-se de maneira irregular e tem, em geral, aspecto coraloide, apresentando abundância de dilatações consideradas uma característica típica da espécie. Os esporângios não apresentam papila e são produzidos em esporangióforos simples ou ramificados. Clamidósporos possuem paredes espessas e podem aparecer em grupos aglomerados, suas estruturas sexuadas, os oósporos, usualmente não ocorrem em culturas não pareadas, mas sim quando tipos de compatibilidade opostos são pareados (CHANG; SHEPHERD; PRATT, 1974). O oogônio não possui ornamentações nas suas paredes e é hialino, desenvolvendo uma suave pigmentação amarelada conforme vai envelhecendo, e o anterídio é anfígeno (ZENTMYER, 1980). Culturas de *P. cinnamomi* comumente produzem micélio aéreo e tem melhor crescimento micelial em temperaturas entre 24 °C e 28 °C podendo suportar extremos de 5 °C e 34 °C (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

A primeira variedade conhecida de *P. cinnamomi* e a única desde 1922, quando a espécie foi descrita pela primeira vez, foi *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* (Rands). No entanto, em 1993 Kröber e Marwitz descreveram *P. cinnamomi* var. *parvispora* (Kröber & Marwitz), isolada de plantas ornamentais do gênero *Beaucarnea* na Alemanha (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Esta variedade difere da *P. cinnamomi* principalmente por apresentar clamidósporos de menor tamanho (16-43 µm) e menor dimensão dos esporângios (média de 36,9 x 25,5 µm), bem como uma temperatura de crescimento mais alta (36-37 °C). Outra variedade de *P. cinnamomi* foi identificada por Ho (2002) a partir de isolamentos obtidos de *Robinia pseudoacacia* (Linn.) na China, *P. cinnamomi* var. *robiniae* (Ho). Esta nova variedade difere das anteriores pela ausência de clamidósporos.

### 2.2.2 Doenças e impactos em espécies florestais

*Phytophthora cinnamomi* é um patógeno generalista de importância global, ameaçando muitas espécies florestais mundialmente. Esta espécie afeta uma ampla gama de hospedeiros, incluindo castanheira, particularmente na América e na Europa, eucaliptos e espécies de *Banksia* na Austrália, e carvalho na Europa Meridional (SENA et al., 2018). Em alguns lugares é uma espécie que se estabeleceu recentemente, enquanto que em outras localizações já se estabeleceu há muitas décadas, e pesquisas recentes sugerem que a gama de árvores hospedeiras de *P. cinnamomi* tem aumentado, no entanto o impacto causado por

esta espécie tem sido ocultado devido a outras ameaças que tem mais visibilidade por causar a morte imediata da planta (ANAGNOSTAKIS, 2001).

Na América do Norte, *P. cinnamomi* é relatado causando declínio da floresta de castanheira desde o século XIX, especialmente na Carolina do Norte (MCKEEVERAND; CHASTAGNER, 2016). No oeste dos Estados Unidos foi associado pela primeira vez com a podridão de raízes do abacateiro (WAGER, 1942) e no Havaí com o declínio de plantas nativas (KLIEJUNAS; KO, 1976a, 1976b). Recentemente, *P. cinnamomi* foi associado com o declínio de castanheira no leste dos Estados Unidos (BALCI et al., 2010; MCCONNELL; BALCI, 2014) e nogueira no Chile (GUAJARDO et al., 2017). Na Europa, o primeiro relato de *P. cinnamomi* causando doença em castanheira (*Castanea sativa* Mill) é do final do século XIX (DAY, 1938; CRANDALL; GRAVATT; RYAN, 1945; BRASIER, 1996) e ressurgiu associada ao declínio de carvalho (*Quercus* L.) e castanheira na França (ROBIN; DESPREZ-LOUSTAU, 1998), Áustria (BALCI; HALMSCHLAGER, 2003), Itália (VETTRAINO et al., 2001; VETTRAINO et al., 2002; SCANU et al., 2013), Espanha (RODRÍGUEZ-MOLINA et al., 2005) e Portugal (BRASIER; ROBREDO; FERRAZ, 1993; MOREIRA; FERRAZ; CLEGG, 1999). Na Austrália, a principal epidemia em larga escala causada por *P. cinnamomi* ocorreu em espécies de eucalipto (*Eucalyptus marginata* Donn. Ex Sm.) e *Banksia* (PODGER; DOEPEL; ZENTMYER, 1965; DAVISON; TAY, 1987; SHEARER; SHEA; DEEGAN, 1987). Na China, a espécie está associada à podridão de raízes na castanheira chinesa e mirtilo (LAN; RUAN; YAO, 2016a, 2016b), no Quênia à podridão de raízes de macadâmia (MBAKA, 2013), e à podridão de raízes de abacateiro na África do Sul (ENGELBRECHT; VAN DEN BERG, 2013; REEKSTING; TAYLOR; VANDENBERG, 2014).

*Phytophthora cinnamomi* é também o agente causal da podridão radicular de raízes em abacate (*Persea americana* Mill), doença de maior importância na produção mundial de abacate (ZENTMYER, 1980). A podridão radicular do abacate é relatada na América Central, América do Sul, Caribe, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul e Califórnia (COOK, 1975). Estima-se que, anualmente, na Califórnia, as perdas em cultivos de abacate, devido à doença causada por *P. cinnamomi*, excedam 40 milhões de dólares (PLOETZ, 2013). No Brasil, a espécie foi relatada causando doença em árvores de abacate e na rizosfera de abacateiros. Santos et al. (2010) fizeram o primeiro relato de *P. cinnamomi* causando doença em árvores



de 20 a 40 anos de araucária (*Araucaria angustifolia*), espécie em risco de extinção, no Paraná. A ocorrência deste patógeno em araucárias foi registrada também na África do Sul (CROUS; PHILLIPS; BAXTER, 2000).

### 2.3 ESTUDOS DE VARIABILIDADE DE ESPÉCIES DE *Phytophthora cinnamomi*

A caracterização de uma população de *P. cinnamomi* deve incluir o estudo da variabilidade fisiológica, morfológica e o gênero *Phytophthora* possui diversos caracteres úteis para descrição fenotípica (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Algumas espécies exibem morfologia muito variável, mesmo quando predomina a reprodução assexuada (CATEN; JINKS, 1968). Muitas teorias existem para tentar explicar este fenômeno, tais como a conversão de genes, recombinação mitótica, cromossomos dispensáveis, mas nenhuma teve evidência significativa suportada (KAMOUN, 2003). Compatibilidade sexual dos isolados ocorre rapidamente através de pareamentos em laboratório (HWANG; KO, 1978), no entanto a recombinação sexual na natureza é rara para esta espécie (CHANG; SHEPHERD; PRATT, 1974; JUDELSON, 2007). Existem poucas evidências que mostram que o genótipo dita às características fenotípicas, como morfologia de esporângios ou taxa de crescimento micelial, no entanto, diferenças genéticas são úteis para se distinguir tipos de compatibilidade. Essa separação entre genótipo e fenótipo pode ser explicada em parte pelo grau de plasticidade na expressão gênica (SCHREIER, 2012).

A diversidade genética interespecífica de *P. cinnamomi* recebeu grande atenção nos últimos anos. Os primeiros estudos utilizaram análise de isoenzimas para medir a diversidade do patógeno (OLD et al., 1988, OUDEMANS; COFFEY, 1991). Desde então outros marcadores foram desenvolvidos e dois principais têm sido utilizados para se medir a variabilidade em escala genômica amplificação de polimorfismos do DNA (RAPD) e “amplified fragment length polymorphisms” (AFLP). O primeiro utiliza primers não específicos para amplificar o DNA genômico e quando as amostras são reveladas em gel de eletroforese, os padrões resultantes podem ser utilizados para identificar um genótipo único (WILLIAMSON et al., 1990). RAPD foi utilizado para medir a variação genética entre populações de *P. cinnamomi*, uma da África do Sul e outra da Austrália (LINDE et al., 1999). A distância genética entre os dois grupos foi mínima e estudos posteriores evidenciaram que a reprodução sexuada nesta área era limitada. Essa técnica foi utilizada também em estudos com

a espécie no Taiwan, confirmando que a população em questão era apenas uma com dois grupos sexuais diferentes (CHANG; YANG; WANG, 1996). Marcadores microsatélites (SSR) oferecem alto grau de polimorfismos para uso em estudos de genética de populações (JARNE; LAGODA, 1996). Isso porque são marcadores compostos de um número de sequências curtas e que se repetem, oferecendo alta variabilidade inter e intraespecífica (GOLDSTEIN et al., 1995).

As regiões intergênicas (ITS1 e ITS2) do rRNA são regiões altamente informativas para o estudo de *Phytophthora*, pois são regiões que divergem rápido o suficiente, possuindo maior variação intraespecífica, o que as torna mais informativas para estudos em nível de filogenia de espécies e populações (MAMMELLA et al., 2011; SCHENA; COOKE, 2006; TOOLEY et al., 2006). Os primers ITS4 e ITS6 são utilizados para amplificar a região ITS em *Phytophthora* (WHITE et al., 1990; COOKE; DUNCAN, 1997; COOKE et al., 2000). Os genes da citocromo oxidase-c, subunidades 1 e 2 (COX1 E COX2, respectivamente) estão organizados como um cluster em *Phytophthora* e devida a variação interespecífica, a região entre estes dois genes pode ser utilizada para o desenvolvimento de marcadores espécie-específicos, bem como para a identificação de espécies baseado no sequenciamento da região (MARTIN; TOOLEY; BLOMQUIST, 2004; TOOLEY et al., 2006). Martin e Coffey (2012) utilizaram genoma mitocondrial de uma variedade de espécies de *Phytophthora* para identificar regiões que poderiam ser úteis como marcadores intraespecíficos para *P. cinnamomi* e descobriram que diferenças intraespecíficas dependem de polimorfismos de um único nucleotídeo e graus de mutação, em sua maioria. O sequenciamento direto do gene também tem sido bastante utilizado para estudar variabilidade genética em populações. Greene et al. (2006) sequenciou três regiões de uma população de isolados de *P. cinnamomi* de *Abies fraseri* (Pursh) na Carolina do Norte, e comparou com isolados de outras regiões geográficas e outros hospedeiros, sendo este o primeiro estudo utilizando o sequenciamento multilocus para caracterizar a diversidade genética da população.

## 2.4 REFERÊNCIAS

- AKINSANMI, O.A.; NEAL, J.; DRENTH, A.; TOPP, B. Characterization of accessions and species of macadamia to stem infection by *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, v. 66, p. 186-193. 2017.
- ANAGNOSTAKIS, S. The effect of multiple importations of pests and pathogens on a native tree. **Biological Invasions**, v. 3, p. 245–254. 2001.
- ANDERSON, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: Mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n.7, p.547-556.2005.
- BALCI, Y.; BALCI, S.; EGGERS, J.; MACDONALD, W.L.; JUZWIK, J. *Phytophthora* species associated with forest soils in eastern and north-central U.S. oak ecosystems. **Plant Disease**, v. 91, p. 705–10. 2007.
- BALCI, Y.; HALMSCHLAGER E. *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees. **Plant Pathology**, v. 52, p. 694–702. 2003.
- BALCI, Y.; HALMSCHLAGER, E. Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. **Forest Pathology**, v. 33, p. 157–174. 2003.
- BALCI, Y.; LONG, R.; MANSFIELD, M.; BALSER, D.; MACDONALD, W. Involvement of *Phytophthora* species in white oak (*Quercus alba*) decline in southern Ohio. **Forest Pathology**, v. 40, p. 430–442. 2010.
- BALDAUF, S. L.; PALMER, J. D. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11558-11562. 1993.
- BLAIR, J. E.; COFFEY, M. D.; PARK, S.; GEISER, D. M.; KANG, S. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 266-277. 2008.
- BRASIER, C.; ROBREDO, F.; FERRAZ, J. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. **Plant Pathology**, v. 42, p. 140–145. 1993.
- BRASIER, C.M. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe: environmental constraints including climate change. **Annales des Sciences Forestieres**, v. 53, p. 347–358. 1996.
- BRITT, J.; HANSEN, E. Phenotypic plasticity, fitness and multilocus genotypes of *Phytophthora ramorum* populations in southern Oregon tanoak forests. **Phytopathology**, v. 99, p.16. 2009.
- BURGESS, T.I.; SCOTT, J.K.; MCDUGALL, K.L.; STUKELY, M.J.; CRANE, C.; DUNSTAN, W.A.; BRIGG, F.; ANDJIC, V.; WHITE, D.; RUDMAN, T. Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. **Global Change Biology**, v. 23, p. 1661–1674. 2017.

- BURGESS, T.I.; WEBSTER, J.L.; CIAMPINI, J.A.; WHITE, D.; HARDY, G.E.; STUKELY, M.J.C. Re-evaluation of *Phytophthora* species isolated during 30 years of vegetation health surveys in western Australia using molecular techniques. **Plant Disease**, v. 93, p. 215–23. 2009.
- CAHILL, D.M.; ROOKES, J.E.; WILSON, B.A.; GIBSON, L.; MCDOUGALL, K.L. *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. **Australian Journal of Botany**, v. 56, p. 279-310. 2008.
- CATEN, C.; JINKS, J. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, p. 329-348. 1968.
- CHANG, S.; SHEPHERD, C.; PRATT, B. Control of sexuality in *Phytophthora cinnamomi*. **Australian Journal of Botany**, v. 22, p. 669-679. 1974.
- CHANG, T.; YANG, W.; WANG, W. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 37, p. 165-171. 1996.
- CHANG, Y.H.; YAN, H.Z.; LIOU, R.F. A novel elicitor protein from *Phytophthora parasitica* induces plant basal immunity and systemic acquired resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, p. 123-136. 2015.
- COOK, A. **Diseases of Tropical and Subtropical Fruits and Nuts**allyn, Hafner Press, New York. US. p. 332. 1975.
- COOKE, D.E.L.; DUNCAN, J.M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. **Mycological Research**, v. 10, p. 667-677. 1997.
- COOKE, D. E. L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J. M.; WAGELS, G.; BRASIER, C. M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 17-32. 2000.
- CRANDALL, B.S., GRAVATT, G., RYAN, M.M. Root disease of *Castanea* species and some coniferous and broadleaf nursery stocks, caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 35, p.162–180. 1945.
- CRANDALL, B.S.; GRAVATT, G.F. The distribution of *Phytophthora cinnamomi*. Part II—Geographical distribution. **Ceiba**, v.13, p. 57-78. 1967.
- CROUS, P.W.; PHILLIPS, A.J.L.; BAXTER, A.P. **Phytopathogenic Fungi from South Africa**. Stellenbosch, South Africa, University of Stellenbosch, Department of Plant Pathology Press. 2000.
- DAVISON, E.; TAY, F. The effect of waterlogging on infection of *Eucalyptus marginata* seedlings by *Phytophthora cinnamomi*. **New Phytologist**, v. 105, p. 585–594. 1987.

DAY, W., Root-rot of sweet chestnut and beech caused by species of *Phytophthora*: I. Cause and symptoms of disease: its relation to soil conditions. **Forestry**, v. 12, p. 101–116. 1938.

DELL, B.; MALAJCZUK, N. Jarrah dieback — A disease caused by *Phytophthora cinnamomi*. Pages 67-87 in **The Jarrah Forest: A Complex Mediterranean Ecosystem**. DELL, B.; HAVEL, J. J.; MALAJCZUK, N, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 1989.

DURÁN, A; GRYZENHOUT, M.; SLIPPERS, B.; AHUMADA, R.; ROTELLA, A.; FLORES, F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. **Plant Pathology**, v. 57, n. 4, p. 715-727. 2008.

ENGELBRECHT, J.; VAN DEN BERG, N. Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. **South African Journal of Science**, v. 109, p. 1–8. 2013.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, USA:APS Press. 1996.

ÉRSEK, T.; RIBEIRO, O. Mini review article: an annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 45, p. 251-266. 2010.

GOLDSTEIN, D. B.; LINARES, A. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. **Genetics**, v. 139, p. 463-471. 1995.

GREENE, M. D.; BENSON, M.; IVORS, K. L. Multilocus sequence analysis of *Phytophthora cinnamomi* from Fraser fir in North Carolina. **Phytopathology**, v. 96, p. 42. 2006.

GUAJARDO, J.; SAA, S.; CAMPS, R.; BESOAIN, X. Outbreak of crown and root rot of walnut caused by *Phytophthora cinnamomi* in Chile. **Plant Disease**, v.10, p. 636-636. 2017.

HANSEN, E. M.; REESER, P. W.; SUTTON, W. *Phytophthora* beyond agriculture. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50(1), p. 359–378. 2012.

HANSEN, E.M.; DELATOUR, C. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. *Ann. For. Sci.*, v. 56, p. 539–47. 1999.

HO, H.H. *Phytophthora cinnamomi* var. *Robiniae* var. *nova* on black locust in Jiangsu province of China. **Mycotaxon** LXXXII, p. 391-396. 2002.

HWANG, S.; KO, W. Biology of chlamydospores, sporangia, and zoospores of *Phytophthora cinnamomi* in soil. **Phytopathology**, v. 68, p. 726-731. 1978.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 424-429. 1996.

JÖNSSON, U.; LUNDBERG, L.; SONESSON, K.; JUNG, T. First records of soilborne *Phytophthora* species in Swedish oak forests. **Forest Pathology**, v. 33, p. 175–79. 2003.

JUDELSON, H. S. Sexual reproduction in plant pathogenic Oomycetes: Biology and impact on disease. Pages 445–458 in: **Sex in Fungi**. J. Heitman, J. W. Kronstad, J. W. Taylor, and L. A. Casselton, eds. ASM Press, Washington D.C., USA. 2007.

JUNG, T.; BLASCHKE, H.; NEUMANN, P. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. **European Journal of Forest Pathology**, v.26, p. 253–72. 1996.

JUNG, T.; COLQUHOUN, I.J.; HARDY, G.E.S.J. New insights into the survival strategy of the invasive soil borne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. **Forest Pathology**, v. 43, p. 266–288. 2013.

JUNG, T.; HANSEN, E. M.; WINTON, L.; OBWALD, W.; DELATOUR, C. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. **Mycological Research**, v. 106, p. 397–411. 2002.

KAMOUN, S. *Phytophthora*. In: KRONSTAD, J. (Ed.) **Fungal pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.237–265. 2000.

KAMOUN, S.; FURZER, O.; JONES, J.D.G.; JUDELSON, H.S.; ALI, G.S.; DALIO, R.J.D.; ROY, S.G.; SCHENA, L.; ZAMBOUNIS, A.; PANABIÈRES, F.; CAHILL, D.; RUOCCO, M.; FIGUEIREDO, A.; CHEN, X.R.; HULVEY, J.; STAM, R.; LAMOUR, K.; GIJZEN, M.; TYLER, B.M.; GRÜNWARD, N.J.; MUKHTAR, M.S.; TOMÉ, D.F.A.; TÖR, M.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; MCDOWELL, J.; DAAYF, F.; FRY, W.E.; LINDQVIST-KREUZE, H.; MEIJER, H.J.G.; PETRE, B.; RISTAINO, J.; YOSHIDA, K.; BIRCH, P.R.J.; GOVERS, F. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.16, p. 413–434. 2015.

KLIEJUNAS, J.T.; KO, W. Association of *Phytophthora cinnamomi* with ohia decline on the island of Hawaii. **Phytopathology**, v. 66, p. 116–121. 1976a.

KLIEJUNAS, J.T.; KO, W. Dispersal of *Phytophthora cinnamomi* on the island of Hawaii. **Phytopathology**, v. 66, p. 457–460. 1976b.

KROON, L. P. N. M.; BROUWER, H.; DE COCK, A. W. A. M.; GOVERS, F. The genus *Phytophthora* anno 2012. **Phytopathology**, v.102, p. 348–364. 2012.

KROON, L.; BAKKER, F. T.; VAN DEN BOSCH, G. B. M.; BONANTS, P. J.; FLIER, W. G. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 766–782. 2004.

LAN, C., RUAN, H., YAO, J. First Report of *Phytophthora cinnamomi* Causing Root and Stem Rot of Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in China. **Plant Disease**, v. 100, p. 2537. 2016a.



LAN, C.; RUAN, H.; YAO, J. First Report of *Phytophthora cinnamomi* Causing Root Rot of *Castanea mollissima* (Chinese Chestnut) in China. **Plant Disease**, v. 100, p. 1248-1248. 2016b.

LINDE, C.; DRENTH, A.; WINGFIELD, M. J. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p.667-680. 1999.

LIYANAGE, N. I. S.; WHEELER, B. E. J. Comparative morphology of *Phytophthora* species on rubber. **Plant Pathology**, v. 38, p.592-597. 1989.

LUZ, E. D. M. O gênero *Phytophthora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 80-81, 2006.

LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: Fungo Protista ou Chomista? In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F. dos; MATSUOKA, K. BEZERRA, J.L. (eds). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Campinas, Livraria Rural, p.1-22, 2001.

MAGALHÃES, D.M.A. **Diversidade de fungos na serapilheira e de *Phytophthora* na rizosfera de plantas da Mata Atlântica no Sul da Bahia**. Dissertação. 139 f. (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 2009.

MAMMELLA, M. A.; CACCIOLA, S. O.; MARTIN, F.; SCHENA, L. Genetic characterization of *Phytophthora nicotianae* by the analysis of polymorphic regions of the mitochondrial DNA. **Fungal Biology**, v. 115, p. 432-442. 2011.

MARTIN, F. N.; COFFEY, M. D. Mitochondrial haplotype analysis for differentiation of isolates of *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 102, p.229-239. 2012.

MARTIN, F.N.; TOOLEY, P.W. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially-encoded cytochrome oxidase I and II genes. **Mycologia**, n.95, p.269-284. 2003.

MARTIN, F.N.; TOOLEY, P.W ; BLOMQUIST, C. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. **Phytopathology**, v. 94, p. 621-631. 2004.

MTAKA, J.N. **The ecology, distribution and population structure of *Phytophthora cinnamomi* associated with root rots and trunk cankers of macadamia in Kenya**. Dissertation. Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology. 2013.

MCCONNELL, M.; BALCI, Y. Fine root dynamics of oak saplings in response to *Phytophthora cinnamomi* infection under different temperatures and durations. **Forest Pathology**, v. 45, p.155–164. 2015.

MCCONNELL, M.; BALCI, Y. *Phytophthora cinnamomi* as a contributor to white oak decline in mid-Atlantic United States forests. **Plant Disease**, v. 98, p. 319–327. 2014.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p. 349-379. 2002.

MCKEEVER, K.; CHASTAGNER, G. A survey of *Phytophthora* spp. associated with Abies in US Christmas Tree Farms. **Plant Disease**, v.100, p.1161–1169. 2016.

MOREIRA, A.; FERRAZ, J.; CLEGG, J. **The involvement of *Phytophthora cinnamomi* in cork and holm oak decline in Portugal**. In: First Int. Meeting on *Phytophthoras* in Forest and Wildland Ecosystems Grand Pass, OR, USA, p. 132–135. 1999.

NOWICKI, M.; FOOLAD, M. R.; NOWAKOWSKA, M.; KOZIK, E. U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. **Plant Disease**, v. 96, p.4-17. 2012.

O'GARA, E.; HOWARD, K.; MCCOMB, J.; COLQUHOUN, I.J.; HARDY, G.E.S.J. Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, v. 64, p. 207-215. 2015.

OLD, K. M.; MORAN, G. F.; BELL, J. C. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 2016-2022. 1984.

OLD, K.; DUDZINSKI, M.; BELL, J. Isozyme variability in field populations of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. **Australian Journal of Botany**, v. 36, p.355-360. 1988.

OUDEMANS, P.; COFFEY, M. D. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. **Mycological Research**, v. 95, p.1025-1046. 1991.

PLOETZ, R.C. *Phytophthora* root rot of Avocado. In *Phytophthora: A Global Perspective* (Lamour, K., ed.). p. 197-203. Wallingford, UK: CAB International. 2013.

PODGER, F.; DOEPEL, R.; ZENTMYER, G. Association of *Phytophthora cinnamomi* with a disease of *Eucalyptus marginata* forest in Western Australia. **Plant Disease Reporter**, v.49, p. 943–947. 1965.

PRATT, B.H.; HEATHER W.A. The origin and distribution of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Australian native plant communities and the significance of its association with particular plant species. **Australian Journal of Biological Science**, v. 26, p. 559-573. 1973.

REEKSTING, B.J.; OLIVIER, N.A.; VANDENBERG, N. Transcriptome responses of an ungrafted *Phytophthora* root rot tolerant avocado (*Persea americana*) rootstock to flooding and *Phytophthora cinnamomi*. **BMC Plant Biology**, v. 16. 2016.

REEKSTING, B.J.; TAYLOR, N.; VANDENBERG, N. Flooding and *Phytophthora cinnamomi*: effects on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in shoots of non-grafted *Persea americana* (Mill.) rootstocks differing in tolerance to *Phytophthora* root rot. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 40–53. 2014.

REEVES, R.J. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* Rands in different soil and water regimes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 7, p.19-24. 1975.

ROBERT, V.; STEGEHUIS, G.; STALPERS, J. 2005. **The MycoBank engine and related databases**. Disponível em: < <http://www.mycobank.org>>. Acesso em janeiro de 2019.

ROBIN, C.; DESPREZ-LOUSTAU, M.-L. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p. 465–475. 1998.

ROBIN, C.; SMITH, I.; HANSEN, E. M. *Phytophthora cinnamomi*. **Forest Phytophthoras**, v. 2, n. 1. 2012.

RODRÍGUEZ-MOLINA, M.; BLANCO-SANTOS, A.; PALO-NÚÑEZ, E.; TORRES-VILA, L.; TORRES-ÁLVAREZ, E.; SUÁREZ-DE-LA-CÂMARA, M.; Seasonal and spatial mortality patterns of holm oak seedlings in: are forested soil infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Forest Pathology**, v. 35, p. 411–422. 2005.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; REIS, A. *Phytophthora* spp.: **Distribuição e Associação com Espécies Florestais**. In: Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 47.; simpósio brasileiro de mofo branco, 2014, Londrina. Desafios futuros: anais. Londrina: SBF. 2014.

SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; ALVES, T. C. A.; VIDA, J. B.; HAKAKAVA, R. Root and Crown Rot of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Journal of Phytopathology**, v. 159, p. 194–196. 2011.

SANTOS, M. V. O. et al. *Phytophthora cinnamomi* na rizosfera de cultivos agrícolas no Sul da Bahia. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1. 2014.

SCANU, B., LINALDEDDU, B.T., FRANCESCHINI, A., ANSELMINI, N., VANNINI, A., VETTRAINO, A.M. Occurrence of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak forests in Italy. **Forest Pathology**, 43, 340–343. 2013.

SCHENA, L.; COOKE, D. E. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a "molecular tool box" for the detection and characterization of *Phytophthora* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 70-85. 2006.

SCHREIER, S. **Diversity among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from ornamental plants in South Carolina**. 167 f. Tese (Mestre em Ciências). 2013.

SCHUMANN, G. L.; D'ARCY, C. J. **Essential Plant Pathology**, Second Edition. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 2010.

SENA K.; CROCKER, E.; VINCELLI, P.; BARTON, C. *Phytophthora cinnamomi* as a driver of forest change: Implications for conservation and management. **Forest Ecology and Management**, v. 409, p.799-807. 2018.

SERRAZINA, S.; SANTOS, C.; MACHADO, H.; PESQUITA, C.; VICENTINI, R.; PAIS, M.S.; SEBASTIANA, M.; COSTA, R. Castanea root transcriptome in response to *Phytophthora cinnamomi* challenge. **Tree Genetics and Genomes**, v. 11, p.1-19. 2015.

SGHAIER-HAMMAMI, B.; VALERO-GALVÁN, J.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M.C.; NAVARRO-CERRILLO, R.M.; ABDELLY, C.; JORRÍN-NOVO, J. Physiological and proteomics analyses of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) responses to *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 71, p.191-202. 2013.

SHEARER, B., SHEA, S., DEEGAN, P. Temperature-growth relationships of *Phytophthora cinnamomi* in the secondary phloem of roots of *Banksia grandis* and *Eucalyptus marginata*. **Phytopathology**, v. 77, p. 661–665. 1987.

SHEARER, B.L.; CRANE, C.E.; COCHRANE, A. Quantification of the susceptibility of the native flora of the south-west botanical province, Western Australia, to *Phytophthora cinnamomi*. **Australian Journal of Botany**, v. 52, p. 435-443. 2004.

SHEPHERD, C.J. *Phytophthora cinnamomi*: An ancient immigrant to Australia. **Search**, v. 6, p. 484-490. 1975.

SMITH, A.L. **Biology of Chlamydospores of *Phytophthora ramorum***. 140 f. Dissertação (Mestre em Ciências, Botânica e Fitopatologia). Oregon State University, Oregon, 2007.

TOOLEY, P. W.; MARTIN, F. N.; CARRAS, M. M.; Frederick, R. D. Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. **Phytopathology**, v. 96, p. 336-345. 2006.

VETTRAINO, A.; BARZANTI, G.; BIANCO, M.; RAGAZZI, A.; CAPRETTI, P.; PAOLETTI, E.; LUISI, N.; ANSELMi, N.; VANNINI, A. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. **Forest Pathology**, v. 32, p.19–28. 2002.

VETTRAINO, A.; NATILI, G.; ANSELMi, N.; VANNINI, A. Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with a resurgence of ink disease in *Castanea sativa* in Italy. **Plant Pathology**, v. 50, p. 90–96. 2001.

VILLA, N. O.; KAGEYAMA, K.; ASANO, T.; SUGA, H. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\beta$ tubulin gene sequences. **Mycologia**, v. 98, p. 410-422. 2006.

WATERHOUSE, G. M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. **Mycological Papers**, n. 92. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, United Kingdom. 1963.

WESTE, G. The dieback cycle in Victorian forests: a 30-year study of changes caused by *Phytophthora cinnamomi* in Victorian open forests, woodlands and heathlands. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, p. 247-256. 2003.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: **PCR protocols: a guide to methods and applications**, (M. A. Inis, D.H. Gelfand, J.J.Sninsky, T.J. White, eds.), San Diego. 1990.

WILLIAMSON, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535.1990.

ZENTMYER, G.A. *Phytophthora cinnamomi* **and the diseases it causes**. St Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.1980.

### 3 CAPÍTULO I – VARIABILIDADE MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE *Phytophthora cinnamomi* ASSOCIADA À ESPÉCIES ARBÓREAS E RIZOSFERA

#### Resumo

*Phytophthora cinnamomi* é uma das espécies de patógenos de plantas mais destrutivas já descritas. É responsável por intensos impactos ecológicos e econômicos devido às doenças por ele causadas em nível global. Dada tal importância e sua presença relatada no Brasil, verificou-se a necessidade de se estudar a diversidade das populações de isolados onde esta espécie está ocorrendo, uma vez que existem relatos desse patógeno em árvores de araucária, abacateiro, plátano e na rizosfera de Mata Atlântica na Bahia. Para isso objetivou-se avaliar aspectos fisiológicos, morfológicos, patogênicos e moleculares de isolados destes hospedeiros de diferentes regiões brasileiras. Foram avaliados, para todos os isolados, o crescimento micelial em oito temperaturas, formação e dimensões de estruturas sexuadas e assexuadas e foi realizada a análise molecular com base nas regiões ITS e COX do DNA, bem como análise filogenética das sequências obtidas. Foram realizados também testes de agressividade em mudas de araucária, avaliados pelo cálculo de incidência, e em frutos de abacate, pelo tamanho da lesão. Houve variação nas características morfológicas, com destaque para dimensões de esporângios. Os testes de agressividade revelaram diferença estatística entre os isolados, sendo o grupo de isolados de araucária o mais agressivo e o de isolados de plátano o menos agressivo. As análises moleculares revelaram a presença de dois agrupamentos distintos de isolados. Os isolados agrupados por meio da análise filogenética têm diferenças morfológicas e patogênicas que suportam o clado formado. Este é o primeiro estudo de variabilidade desta espécie no Brasil.

**Palavras-chave:** Diversidade, Oomiceto, *Persea americana*, *Araucaria angustifolia*

**MOLECULAR, MORPHOPHYSIOLOGICAL AND PATHOGENIC  
CHARACTERIZATION OF *Phytophthora cinnamomi* ASSOCIATED WITH  
ARAUCARIA, AVOCADO, *PLATANUS* AND RHIZOSPHERE**

**ABSTRACT**

*Phytophthora cinnamomi* is one of the most destructive plant pathogen species described. It is responsible for intense ecological and economic impacts due to the diseases it causes globally. Given this importance and its reported presence in Brazil, it was verified the need to study the diversity of populations of isolates where this species is occurring, since there are reports of this pathogen in araucaria, avocado, plane trees and rhizosphere from Mata Atlântica in Bahia. The objective of this study was to evaluate the physiological, morphological, pathogenic and molecular aspects of isolates of these hosts from different Brazilian regions. The mycelial growth of the isolates at eight temperatures, the formation and dimensions of sexual and asexual structures were evaluated for all the isolates and the molecular analysis based on the ITS and COX regions of the DNA was performed, as well as phylogenetic analysis of the sequences obtained. Tests of aggressiveness on araucaria seedlings were also carried out, by the calculation of incidence, and in avocado fruits, by the size of the lesion. There was variation in the morphological characteristics, with emphasis on sporangia dimensions. The aggressiveness tests revealed a statistical difference between the isolates, being the group of isolates of araucaria the most aggressive and the group of isolates of plane trees, the less aggressive. Molecular analyzes revealed the presence of two distinct clusters of isolates. The isolates grouped by phylogenetic analysis have morphological and pathogenic differences that support the formed clade. This is the first study of variability of this species in Brazil.

**Key-words:** Diversity, Oomycete, *Persea americana*, *Araucaria angustifolia*



### 3.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Phytophthora* contém inúmeros fitopatógenos de importância histórica, econômica e ecológica, desde *P. infestans*, patógeno responsável pela fome na Irlanda até o patógeno responsável pela devastação de florestas nativas na Austrália, *P. cinnamomi* (DELL; MALAJCZUK, 1989; ERWIN; RIBEIRO, 1996; NOWICKI et al., 2012). Um grande número de espécies de *Phytophthora* causa danos em muitas culturas, plantas lenhosas e herbáceas (HARDY; SIVASITHAMPARAM, 1988; ERWIN; RIBEIRO, 1996; JONES; BENSON, 2001). Mais de 100 espécies foram identificadas e a maioria destas são fitopatogênicas (ÉRSEK; RIBEIRO, 2010; KROON et al., 2012).

Dentre as espécies de *Phytophthora*, nenhuma outra teve um efeito tão devastador e em uma gama de hospedeiros amplamente distribuída como *Phytophthora cinnamomi* Rands. Esta espécie foi descrita por Rands em 1922 em *Cinnamomum burmannii* (Blume) na Sumatra e, desde então, têm sido descrita como agente causal de doenças em mais de 1000 espécies de plantas em mais de 67 países (ZENTMYER, 1980; JUNG et al., 2013). O patógeno foi introduzido na Austrália Ocidental e teve um impacto significativo neste país (ZENTMYER, 1980; SHEARER, 2004).

*Phytophthora cinnamomi* é um oomiceto que pode sobreviver no solo mesmo na ausência do hospedeiro por períodos prolongados (JONES; BENSON, 2001; ZENTMYER, 1980). O desenvolvimento da doença é favorecido por solos encharcados ou saturados que permitem que os zoósporos móveis locomovam-se pelo filme de água entre as partículas de solo e raízes (HARDHAM, 2005). Estas condições edáficas favorecem o desenvolvimento da doença criando condições anaeróbicas que ocasionam estresse no sistema radicular das plantas e as tornam mais suscetíveis à infecção. Ao longo dos anos este patógeno esteve associado a um grande número de hospedeiros, e estima-se que estes variem de 900 a 3.000 espécies (ERWIN; RIBEIRO, 1996; HARDHAM, 2005; MARTIN; COFFEY, 2012). A infecção por *P. cinnamomi* tem por sintomas típicos a podridão de raízes e do colo da planta que pode levar à morte (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Apesar do impacto mundial causado por *P. cinnamomi*, informações sobre variações fenotípicas e genotípicas entre isolados de populações são limitadas (HÜBERLI; HARDY; TOMMERUP, 2001). Para se adotar estratégias de controle

adequadas às doenças causadas por este patógeno, é importante conhecer o quanto de variação fenotípica existe dentro de uma população. Quando *P. cinnamomi* foi descrito, Rands (1922) demonstrou que isolados variavam na patogenicidade quando inoculados em troncos de árvores *C. burmanni*. Desde então muitos relatos têm sido reportados de variações macromorfológicas (tipo de colônia e crescimento) e micromorfológicas (esporângios e gametângios) em coleções de isolados de *P. cinnamomi* do mundo (DUDZINSKI; OLD; GIBBS, 1993). Hüberli et al., (1997a) sugerem que diferenças na variabilidade fenotípica entre populações na Austrália existem e explicam que a ausência de medidas de controle do patógeno durante um período de 50 anos desde a sua introdução em comunidades naturais de plantas permitiu que ocorresse a movimentação do patógeno e sua variabilidade.

No Brasil, os estudos acerca desta espécie são escassos e as informações sobre sua morfologia, patogenicidade e diversidade de populações são limitadas. Mundialmente, *P. cinnamomi* é uma espécie bastante estudada, mas no Brasil de maneira geral, não existem estudos sobre a espécie e sim relatos da ocorrência do patógeno, tratando-se de registros de hospedeiros, onde não foi realizada a caracterização e identificação específica de *Phytophthora* (SANTOS; LUZ; REIS, 2014). A espécie foi relatada causando doença em árvores de abacateiro e em árvores de araucária na região sul do Brasil (SANTOS et al., 2011) e foi encontrada também na rizosfera de plantas da Mata Atlântica na Bahia (MAGALHÃES, 2009; LUZ et al., 2001). *Phytophthora cinnamomi* foi relatada associada à morte de árvores de plátano (*Platanus acerifolia*) na região sul do Brasil (Capítulo II).

Dessa forma, objetivou-se o estudo da variabilidade morfofisiológica, molecular e patogênica de isolados de *P. cinnamomi* provenientes de araucária, abacateiro, rizosfera de Mata Atlântica e plátano, e de diferentes regiões brasileiras para determinar a existência de tipos intraespecíficos.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Origem dos isolados

Para o estudo foram utilizados isolados de *Phytophthora cinnamomi* da coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas e novos isolados obtidos e posteriormente caracterizados. As amostras de solo para isolamento foram

processadas pelo método de isca em frutos. O solo foi homogeneizado e uma subamostra foi colocada em um recipiente plástico devidamente desinfestado com álcool 70% e, logo após, foram colocados frutos de abacate como iscas (BURNS et al. 1965). Posteriormente, o recipiente foi preenchido até a metade da capacidade com água ultrapurificada esterilizada e cobriu-se os recipientes com filme plástico e mantido sob luz fluorescente contínua, no ambiente de laboratório. Após quatro dias observou-se a formação de uma linha enegrecida na casca do fruto de abacate e procedeu-se o isolamento a partir da coleta de fragmentos da região de transição entre tecido sadio e doente, retirando-se previamente a casca. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri (90 mm de diâmetro) com meio ágar-água 2% suplementado com antibióticos (ampicilina 80 ppm e cloranfenicol 40 ppm). As placas foram colocadas em câmara BOD a 24 °C ( $\pm$  2) por quatro dias, no escuro. Após esse período, os isolados obtidos foram repicados para placas contendo meio V8-ágar (200 mL de suco V8, 3 g de CaCO<sub>3</sub>, 18 g de ágar e 800 mL de água ultrapurificada). Depois de purificados, os isolados foram incorporados à coleção do Laboratório de Patologia Florestal da EMBRAPA- Florestas, mantidos em frascos com água, pelo método Castellani.

Foram utilizados isolados de *P. cinnamomi* provenientes de araucária, da região Sul do Brasil, abacateiro, provenientes de árvores da região Sul e Sudeste do Brasil, plátano, provenientes da região Sul do Brasil e isolados da rizosfera de Mata Atlântica, da região Nordeste do Brasil. Os isolados de *P. cinnamomi* de Mata Atlântica da Bahia foram fornecidos pela Dra. Edna D. M. N. Luz (CEPLAC).

### 3.2.2 Caracterização morfofisiológica

#### 3.2.2.1 Aspecto das colônias

Os isolados foram incubados em meio V8-ágar em câmara BOD a 24 °C ( $\pm$  2) em ausência de luz para a avaliação do aspecto das colônias, por sete dias. O aspecto das colônias foi classificado em: cotonoso, rosáceo, estrelado; o micélio classificado como: denso, pouco denso e aéreo, de acordo com o estabelecido na literatura (ERWIN, RIBEIRO, 1996).

### 3.2.2.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial

Foram realizados experimentos de curva de crescimento micelial nas temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36 °C. As placas para o experimento foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado em câmara BOD, com três repetições por isolado. Os isolados foram incubados a 24 °C ( $\pm 2$ ) em meio V8-ágar por cinco dias e, posteriormente, foram repicados discos de meio contendo micélio ativo de cinco mm de diâmetro para o centro de placas contendo o mesmo meio. As placas foram incubadas nas oito temperaturas, em ausência de luz, com três repetições por isolado e o crescimento foi mensurado ao terceiro, quinto e sétimo dia após a instalação. As medições foram realizadas nos sentidos diametralmente opostos do crescimento radial da colônia, utilizando-se um paquímetro digital (Starrett®, série 799). O diâmetro da colônia foi expresso pela média aritmética das duas medidas e então calculou-se a média das três repetições. Para estimar a temperatura ótima de crescimento dos isolados foi realizada a análise de regressão e obtida a derivada da equação das curvas de temperatura de cada isolado.

### 3.2.2.3 Produção e avaliação de estruturas assexuadas

As estruturas assexuadas, tais como esporângios e clamidósporos dos isolados de *P. cinnamomi*, foram avaliadas quanto à forma, disposição e dimensões dos esporângios e presença ou ausência e dimensões, para clamidósporos. Para a produção dos esporângios, os isolados foram incubados a 24 °C ( $\pm 2$ ) por cinco dias no escuro em placa de Petri contendo meio V8-ágar. Posteriormente, discos de cinco mm de diâmetro de meio contendo micélio com crescimento ativo foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo meio V8 líquido, e estes foram incubados em BOD a 24 °C por sete dias em luz contínua. Após este período, o micélio crescido foi lavado três vezes em água ultrapurificada e transferido para placas contendo 10 mL de extrato de solo filtrado não esterilizado (1000 mL de água ultrapurificada e 40 g de solo) segundo metodologia proposta por Erwin e Ribeiro (1996), fragmentado e incubado a 24 °C sob luz contínua por 72 h. Em seguida, foram preparadas lâminas de microscopia com o micélio fragmentado com corante lactoglicerol com azul de metileno, as quais foram utilizadas para observação em microscópio ótico ZEISS Axio Scope no aumento de 400x. Neste aumento, os esporângios foram caracterizados e suas dimensões aferidas, sendo realizadas

medições de 50 estruturas por isolado. Nas lâminas confeccionadas a partir do extrato, e a partir de placas de Petri contendo a colônia, foi possível avaliar também tipo de hifa e os clamidósporos, sendo realizadas também medições de 50 estruturas por isolado, quando presente.

#### 3.2.2.4 Produção e avaliação de estruturas sexuadas

Os isolados de *P. cinnamomi* foram classificados quanto ao seu grupo de compatibilidade, avaliando-se a formação da estrutura sexuada, o oósporo, durante os pareamentos. Para tanto, os isolados foram incubados em meio V8-água a 24 °C no escuro por cinco dias e, posteriormente, foram pareados em placas de Petri contendo o mesmo meio com os padrões A1 e A2 de *P. frigida*, pertencentes à coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas. As placas foram incubadas a 24 °C, no escuro, por dez dias e, posteriormente, procedeu-se o preparo de lâminas para observação em microscópio óptico ZEISS® Axio Scope no aumento de 400x. Foram feitas medições de 50 oósporos formados e estes foram avaliados quanto a sua morfologia, bem como a posição do anterídio.

#### 3.2.3 Caracterização molecular

Para a análise molecular, os isolados foram amplificados e sequenciados para a região da subunidade 5.8s do rRNA (ITS) a região compreendida entre os genes que codificam as subunidades 1 e 2 da citocromo oxidase-c (gene COX). Para a extração do DNA os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio V8-água por cinco dias e, posteriormente, dez discos de meio contendo micélio foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo meio líquido de V8. Os foram colocados sob agitação contínua por 24 h e então o micélio formado foi retirado, lavado com água ultrapura e seco em papel filtro esterilizado. Foram pesadas 40 mg de micélio, colocadas em microtubos e logo após, foi adicionada a solução de lise celular contida no kit de extração. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por uma hora e posteriormente seguiu-se o protocolo de extração do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para a identificação dos isolados, foram amplificadas as regiões ITS1, ITS2 e gene 5.8S do DNA ribossômico empregando-se os pares de *primers* ITS6/ITS4 (WHITE et al, 1990) e COX1 e COX2 empregando-se os pares de *primers* FMPhy-10b/FMPhy-8b (MARTIN et al., 2007). A reação de PCR para a região ITS

dos isolados foi realizada com um volume final de 15 µL sendo tampão de reação 1X, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de DNTP, primers 0,4 mM e 0,75 U de Taq polimerase. Para a amplificação foram realizados 35 ciclos que consistiam de 1 min a 94 °C para desnaturação, 1 min a 55 °C para anelamento e 1 min a 72 °C para extensão com 10 min de extensão final. A reação de PCR para a região COX dos isolados foi realizada com um volume final de 25 µL sendo utilizado tampão de reação 1X, 3 mM cloreto de magnésio, 0,2 mM de DNTP, primers 0,4 mM e de 2 U de Taq polimerase. Foram realizados 40 ciclos que consistiam de 30 s a 95 °C para desnaturação, 30 s a 55 °C para anelamento e 30 s a 72 °C para extensão com 10 min de extensão final. Os produtos da PCR foram submetidos à análise em gel de agarose 1,5% para a visualização dos fragmentos amplificados de interesse. Após, os fragmentos foram purificados e procedeu-se o sequenciamento utilizando-se o kit BigDye *Terminator* v3.1 Cycle Sequencing, conforme recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems), na UFPR. As sequências obtidas foram comparadas com acessos depositados no GenBank utilizando-se o “Nucleotide BLAST” no servidor do NCBI e com sequências depositadas no *Phytophthora*-ID, para identificação.

#### 3.2.4 Análise filogenética

As sequências obtidas foram corrigidas, preparadas e alinhadas utilizando o ClustalW no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2006). O melhor modelo evolutivo para a análise filogenética foi determinado utilizando o pacote de análise de dados incluído no software e as duas regiões sequenciadas (ITS e COX) foram adicionadas à análise e comparadas às depositadas no *Phytophthora*-ID, para a formação da árvore filogenética dos isolados. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining e os valores de bootstrap foram calculados utilizando o modelo Tamura 3-parâmetros. Foram utilizadas como *outgroup* as sequências de *Phytium vexans* (ITS) e *Phytium ultimum* (COX), para realizar os agrupamentos. As sequências foram obtidas no banco de dados do *GenBank*.

#### 3.2.5 Caracterização patogênica

Para avaliação da patogenicidade, os isolados de *P. cinnamomi* foram inoculados em mudas de araucária e frutos de abacate, uma vez que estes são os

dois grupos de hospedeiros principais dos quais os isolados são provenientes. Foram utilizadas mudas de araucária de seis meses de idade e frutos de abacate sadios sem nenhum tipo de lesão. Para ambos os testes os isolados foram crescidos em meio V8-ágar a 24 °C, no escuro, por cinco dias. Os experimentos em mudas foram conduzidos durante o verão e outono (novembro de 2016 – março de 2017) e os experimentos com frutos de abacate foram conduzidos no outono (março de 2017 – abril 2017).

As mudas de araucária foram previamente limpas com álcool 70 % na região do colo, de onde foram cortadas todas as acículas, deixando apenas uma para inoculação. Então, a acícula foi retirada causando um ferimento superficial no colo da planta. Um disco de cinco mm de diâmetro de meio V8-ágar contendo micélio com crescimento ativo foi retirado de cada isolado e colocado na região ferida do colo e, em seguida, coberto com fita branca. Foram realizadas cinco repetições para cada isolado. A testemunha recebeu um disco de cinco mm de meio de cultura V8-ágar sem o patógeno. Foram feitas avaliações semanais a partir do décimo quarto dia após a inoculação e a avaliação foi finalizada 91 dias após a inoculação. Avaliou-se planta sadia, sintomática (com murcha apical e amarelecimento de acículas) e morta (amarelecimento total e morte da planta).

Para o teste de patogenicidade em frutos destacados de abacate, os frutos foram desinfestados com álcool 70 % e lavados com água ultrapurificada esterilizada e, posteriormente, foram feitos ferimentos que consistiam de cinco furos com um estilete de ponta fina na casca dos frutos. Discos de cinco mm de diâmetro de meio contendo crescimento micelial ativo do patógeno foram colocados sobre os ferimentos, cobrindo-os posteriormente com algodão umedecido com água ultrapurificada esterilizada. Os discos foram cobertos por fita adesiva e os frutos foram acondicionados em bandejas contendo papel esterilizado umedecido com água ultrapurificada esterilizada e, posteriormente, fechadas com filme plástico. O material foi incubado no ambiente de laboratório sob luz contínua por sete dias. Neste período, as temperaturas variaram de 18 a 24 °C. Na testemunha colocou-se um disco de cinco mm de diâmetro de meio de cultura sem micélio. A avaliação foi feita no sétimo dia e consistiu na determinação do tamanho da lesão.

Os testes em mudas e em frutos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados, com cinco repetições por isolado para as mudas e quatro repetições por isolado para os frutos. A agressividade dos isolados foi representada



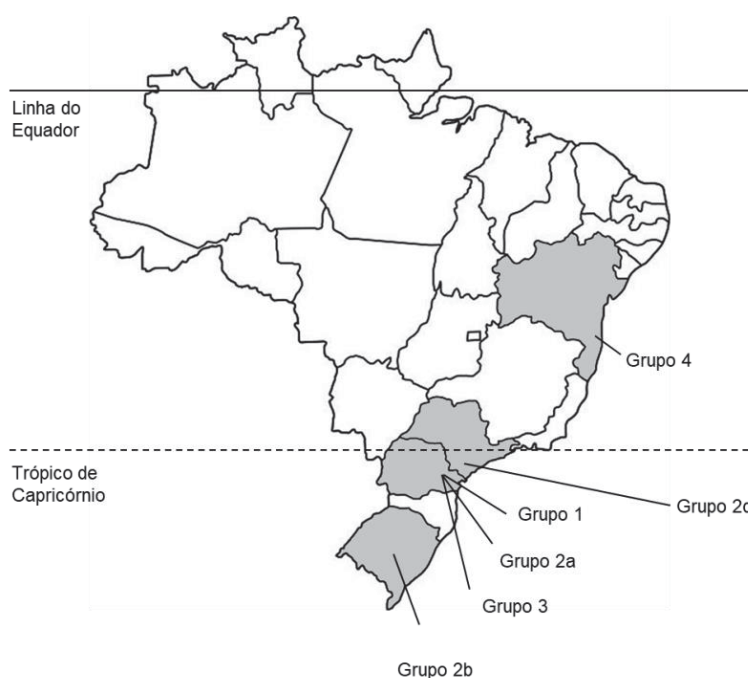
pelo cálculo da incidência de mudas de araucária mortas e no tamanho médio das lesões dos frutos de abacate. Foram realizadas análises de variância para os valores de incidência e de tamanho da lesão e as médias foram comparadas através dos testes de Tukey e Scott-Knott, respectivamente, para verificar diferenças entre os isolados. As análises estatísticas foram realizadas no software Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Caracterização morfofisiológica

Os isolados de *P. cinnamomi* foram divididos em seis grupos de acordo com o hospedeiro: Grupo 1 (38 isolados provenientes de araucária - Paraná); Grupo 2, subdividido em 2A (2 isolados de abacateiro - Paraná) 2B (10 isolados provenientes de abacateiro - Rio Grande do Sul) e 2C (6 isolados provenientes da rizosfera de abacateiro - São Paulo); Grupo 3 (5 isolados provenientes de árvores de plátano - Paraná); e Grupo 4 (14 isolados provenientes da rizosfera de Mata Atlântica – Bahia) (FIGURA 1). A lista de isolados e sua procedência está apresentada na TABELA 1.

FIGURA 1 - ESTADOS BRASILEIROS DE ORIGEM DOS GRUPOS DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DESTE ESTUDO.



FONTE: O autor (2018).

TABELA 1– ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* UTILIZADOS NESTE TRABALHO E PROCEDÊNCIA

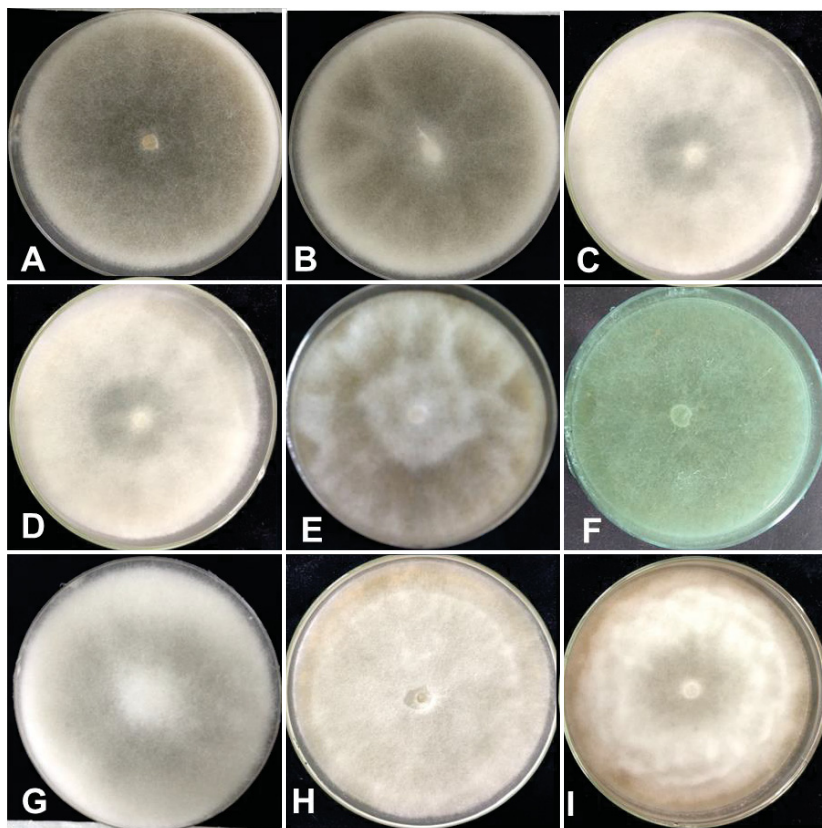
(continua)

Isolado	Procedência
<b>Grupo 1 – Araucária</b>	
AR-2, AR-20, AR-21, AR-22, AR-23, AR-24, AR-25, AR-26, AR-27, AR-43, AR-43A, AR-44, AR-44A, AR-45, AR-45A, AR-46, AR-46A, AR-47, AR-47A, AR-49, AR-50, AR-51, AR-52	Boaventura de São Roque – PR
AR-30, AR-31, AR-32, AR-33, AR-34, AR-35, AR-36, AR-37, AR-38	Colombo – PR
AR-40, AR-40A, AR-41, AR-41A, AR-42, AR-42A	Prudentópolis – PR
<b>Grupo 2 – Abacateiro</b>	
AB-1, AB-2, AB-3, AB-5, AB-6, AB-8, AB-9, AB-11, AB-14, AB-15	Porto Alegre – RS
AB-19, AB-20	Curitiba – PR
AB-21, AB-21A, AB-21B, AB-21C, AB-22, AB-22A	Vale do Ribeira – SP
<b>Grupo 3 – Plátano</b>	
PLATANO A, PLATANO B, AMOSTRA 1B, AMOSTRA 2A, AMOSTRA 2C	Curitiba – PR
<b>Grupo 4 – Rizosfera*</b>	
1137, 1149, 1150, 1172, 1174, 1175, 1186, 1335, 1336, 1407, 1408, 2383, 2386, 2412	Ilhéus - BA

NOTA: \*Isolados cedidos pela Dra. Edna Dora M. N. Luz (CEPEC/CEPLAC – Ilhéus-BA).

As características observadas em todos os isolados de *P. cinnamomi* foram: micélio hialino, com hifas cenocíticas e presença de dilatação nas hifas. No entanto, os isolados apresentaram três padrões de colônias: rosáceo, cotonoso e estrelado, sendo o mais frequente o rosáceo (FIGURA 2). Dentre os isolados provenientes de araucária, quinze apresentaram padrão rosáceo, dois padrão ligeiramente rosáceo, oito padrão ligeiramente estrelado, dez cotonoso e três apresentaram padrão ligeiramente cotonoso. O grupo proveniente de abacateiro teve oito isolados de padrão cotonoso e nove de padrão rosáceo, com um isolado sendo classificado como ligeiramente rosáceo. Os cinco isolados de plátano se enquadraram no padrão cotonoso. Dos isolados provenientes da rizosfera da Mata Atlântica da Bahia, seis apresentaram padrão cotonoso, quatro padrão estrelado, dois padrão ligeiramente rosáceo, um isolado apresentou padrão rosáceo e um isolado padrão ligeiramente estrelado.

FIGURA 2 – ASPECTO DAS COLÔNIAS DE *Phytophthora cinnamomi*. A (AR21 – PADRÃO COTONOSO), B (AR40 – LIGEIRAMENTE ESTRELADO) E C (AR45 – ROSÁCEO) ISOLADOS DO GRUPO 1 - ARAUCÁRIA; D (AB19 – PADRÃO COTONOSO) E E (AB9 – PADRÃO ROSÁCEO) GRUPO 2 - ABACATEIRO; F (AMOSTRA1B – PADRÃO COTONOSO) GRUPO 3 - PLÁTANO, G (1124 – PADRÃO COTONOSO), H (1335 – PADRÃO ESTRELADO) E I (1336 – PADRÃO ROSÁCEO) GRUPO 4 - RIZOSFERA



FONTE: O autor (2017).

A temperatura influenciou no crescimento micelial dos isolados de *P. cinnamomi*. Não houve crescimento micelial de nenhum isolado a 8 °C e a 36 °C. A temperatura ótima de temperatura para o crescimento dos isolados em geral foi de 22 °C. As curvas de crescimento dos isolados e as temperaturas ótimas estão representadas nas FIGURAS 3 (Grupo 1), 4 (Grupo 2), 5 (Grupo 3) e 6 (Grupo 4). A 12 °C alguns isolados tiveram um diâmetro maior de crescimento ao final do sétimo dia de avaliação quando comparados a outros. No grupo de isolados de araucária o isolado AR-49 teve um crescimento maior (38,11 mm) e no grupo de isolado da rizosfera o isolado 1408 teve crescimento de 59,25 mm. A 16 °C o isolado AR-41 teve crescimento pronunciado (63,18 mm), bem como os isolados AB-21(75,82 mm) e AB-21A (78,32 mm), estes dois que também tiveram crescimento maior quando comparados aos outros isolados a 32 °C (ambos obtiveram o máximo crescimento em placa). Além dos isolados AB-21 e AB-21A os isolados AR-41, AR-47, ambos de

araucária, e os isolados PA e PB, ambos provenientes de plátano, destacaram-se em geral neste parâmetro avaliado, pois apresentaram crescimento relativamente maior que os outros isolados em todas as temperaturas testadas. As características culturais e de temperatura dos grupos de isolados estão apresentadas na TABELA 2.

TABELA 2– RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS CULTURAIS E TEMPERATURA DE CRESCIMENTO MICELIAL DE *Phytophthora cinnamomi* DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO, RIZOSFERA E DE DESCRIÇÕES ANTERIORES.

Característica	Araucária	Abacate	Plátano	Rizosfera	<i>P. cinnamomi</i> (Waterhouse , 1963)	<i>P. cinnamomi</i> (Waterhouse , Stamps, 1990)
Nº de isolados	38	18	5	14	2	-
Padrão de Colônia	Rosáceo	Rosáceo	Cotonoso	Cotonoso	Rosáceo	Rosáceo
Micélio	Aéreo – pouco denso	Aéreo - denso	Aéreo – pouco denso	Aéreo - denso	Aéreo	Denso
Forma dos esporângios	Elipsoide, obovoide	Elipsoide, obovoide	Elipsoide, globoso	Elipsoide	Elipsoide, ovoide	Elipsoide, ovoide
Temperatura ótima	22 °C	22 °C	22,8 °C	22 °C	25-28 °C	-
Temperatura máxima	32 °C	32 °C	32 °C	32 °C	32-34 °C	34 °C
Temperatura mínima	12 °C	12 °C	12 °C	12 °C	5 °C	-

FIGURA 3 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 1 - ARAUCÁRIA EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(continua)

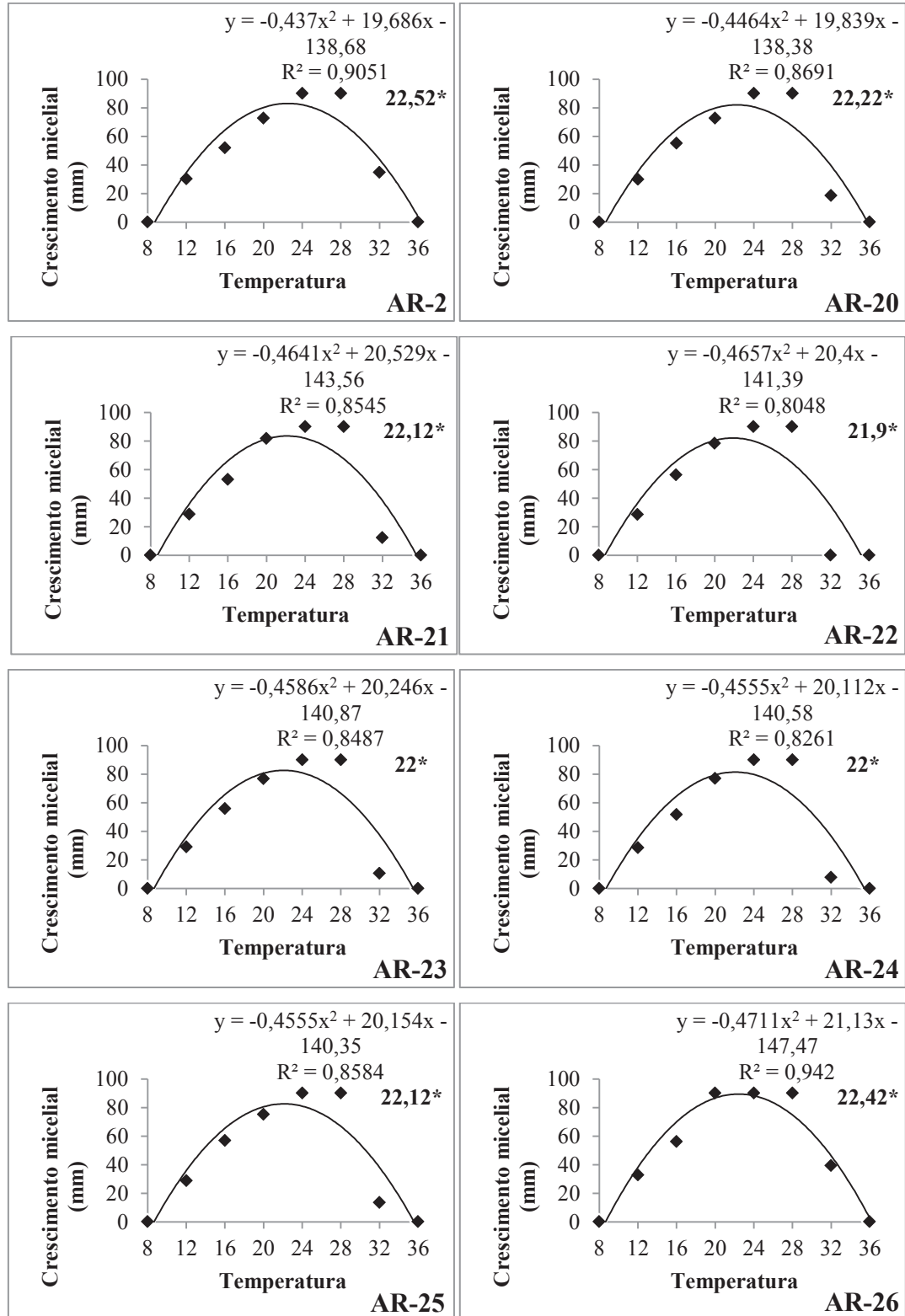


FIGURA 3 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 1 - ARAUCÁRIA EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(continuação)

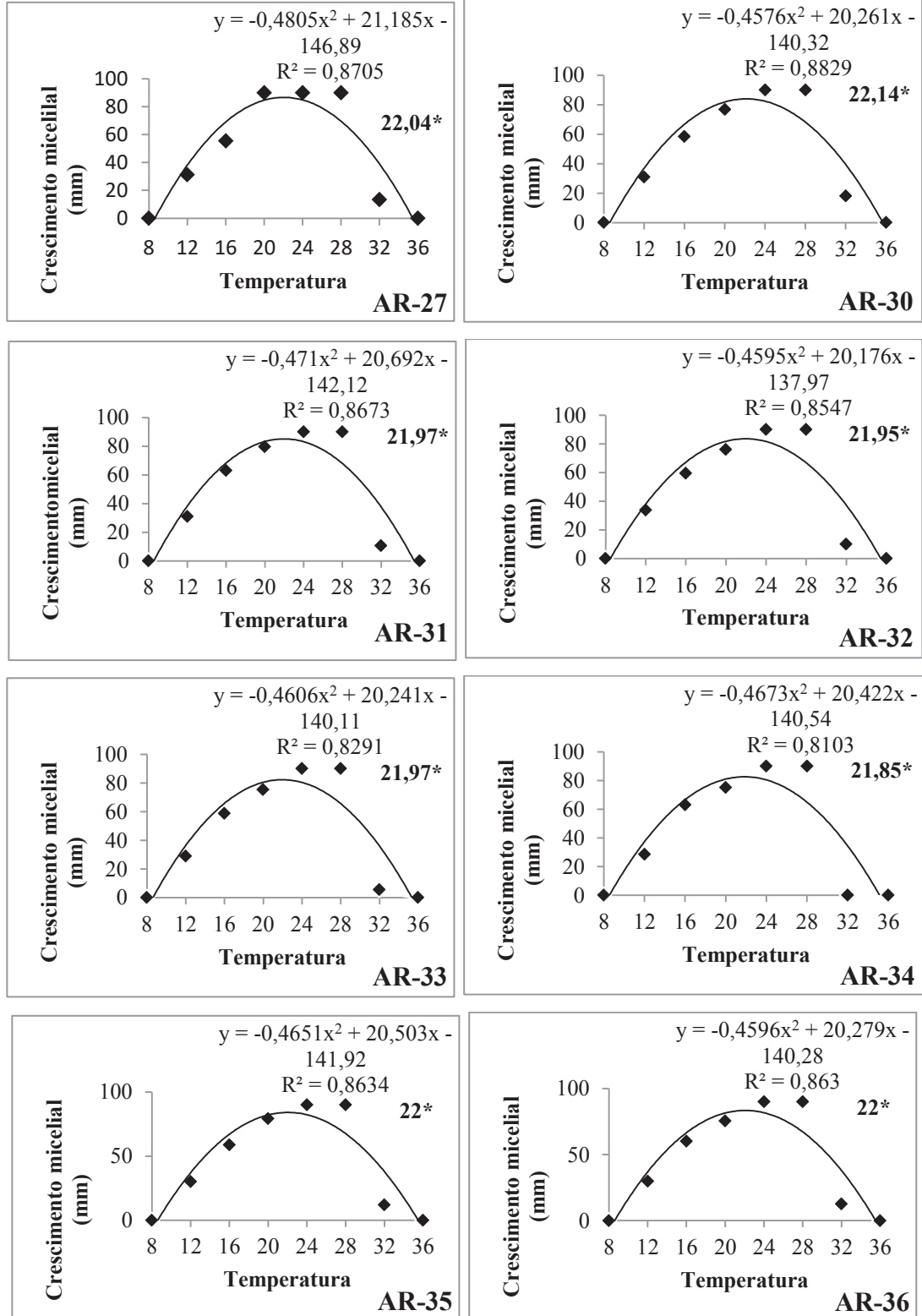


FIGURA 3 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 1 - ARAUCÁRIA EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(continuação)

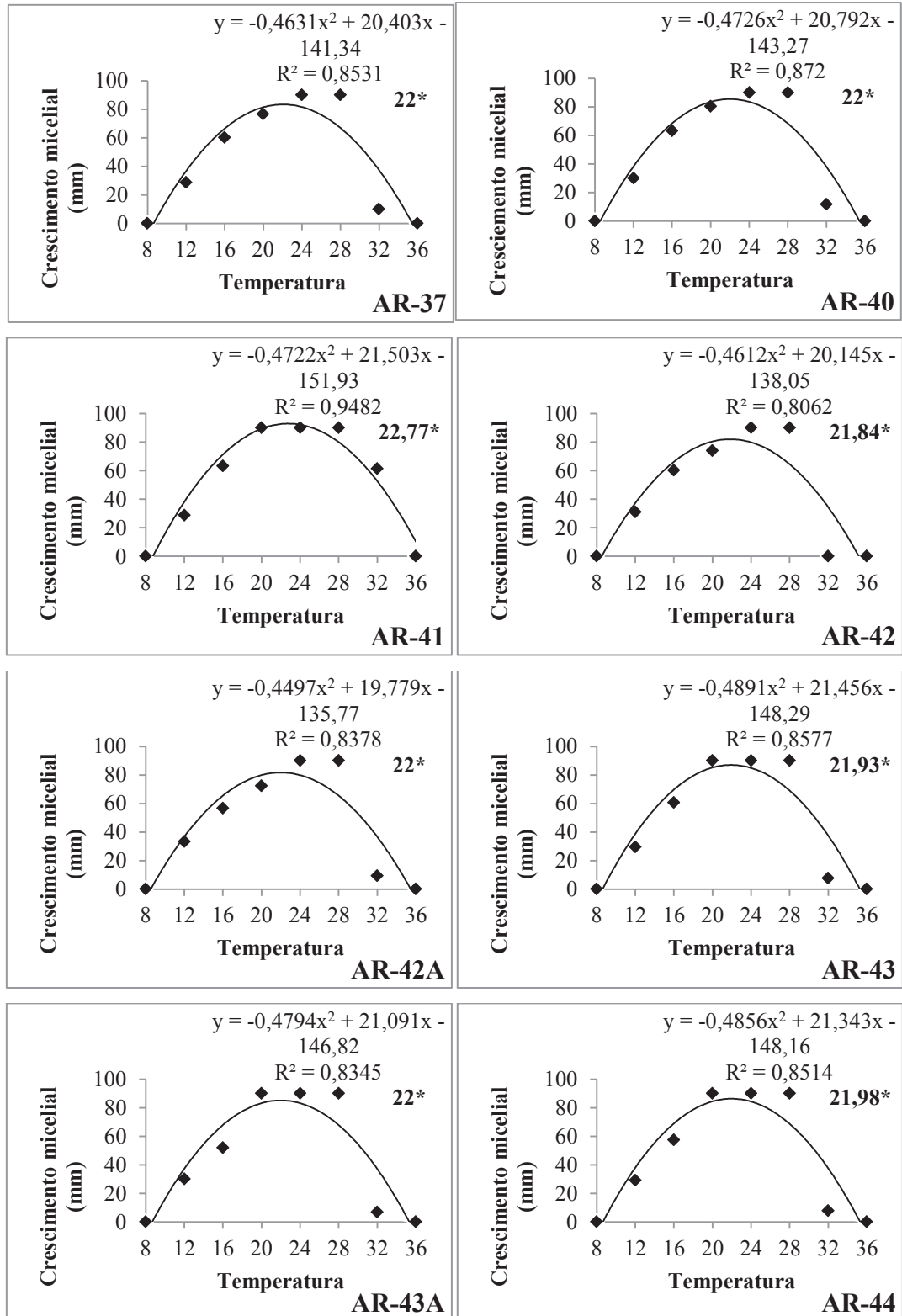




FIGURA 3 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 1 - ARAUCÁRIA EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(continuação)

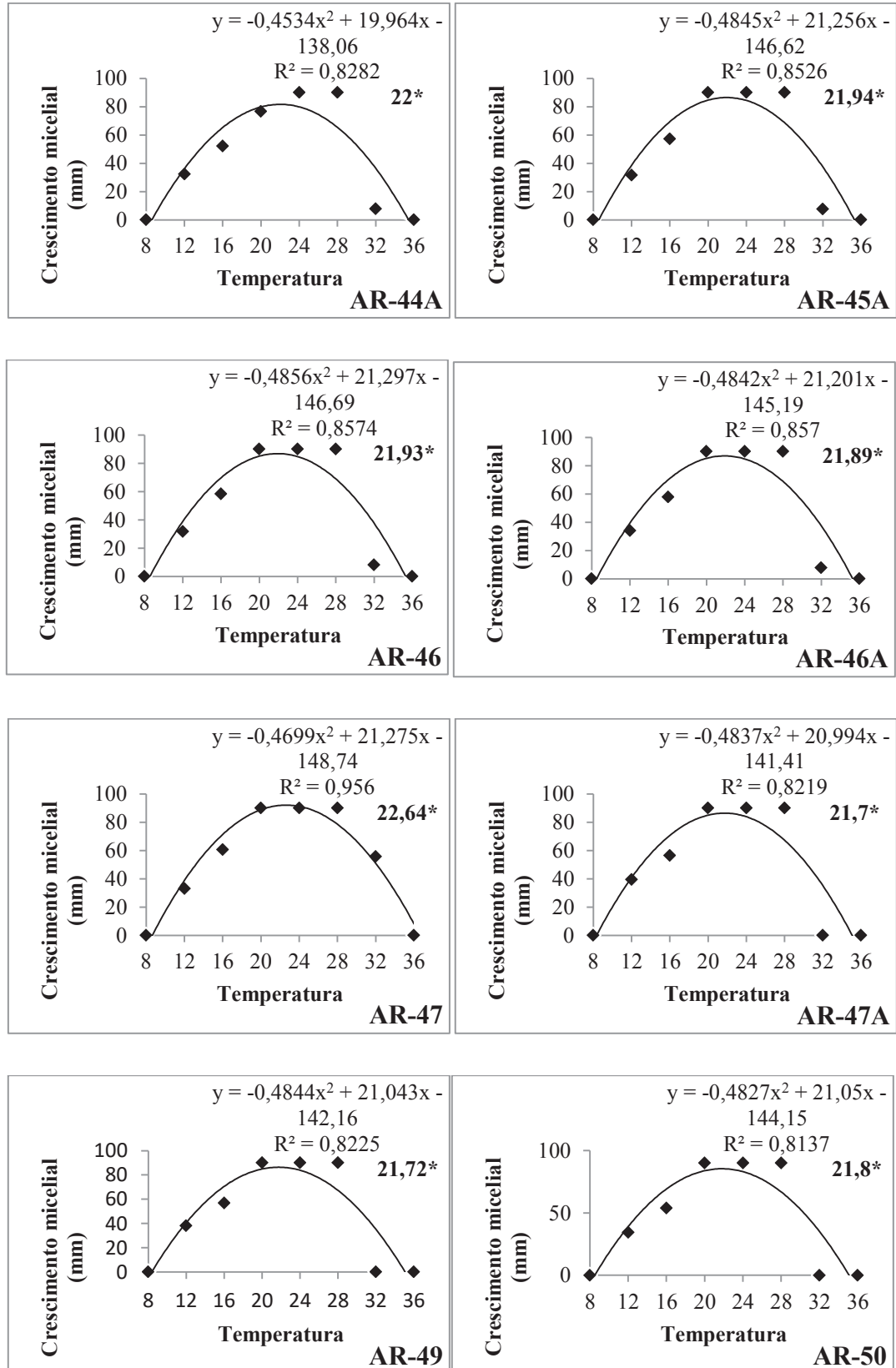


FIGURA 3 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 1 - ARAUCÁRIA EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(conclusão)

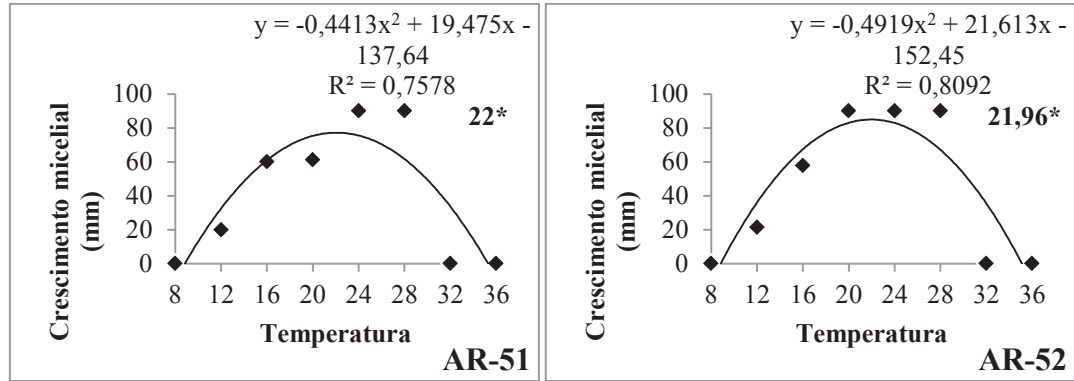


FIGURA 4 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 2 - ABACATEIRO EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(continua)

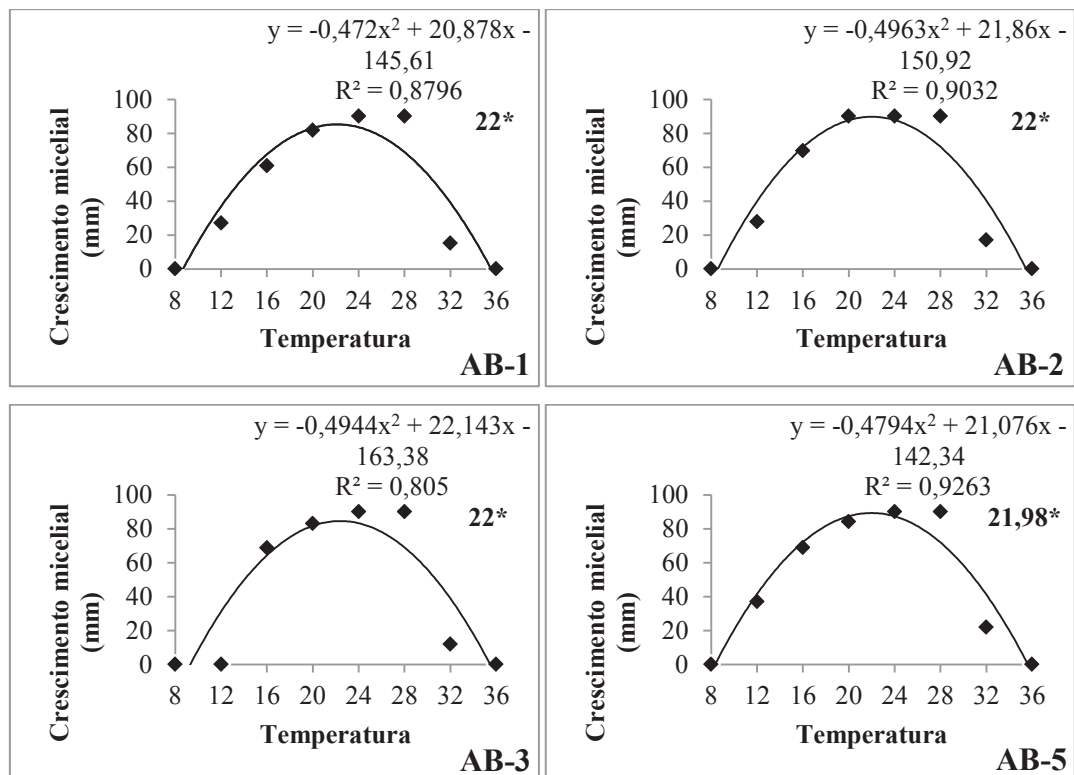


FIGURA 4 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 2 - ABACATEIRO EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(continuação)

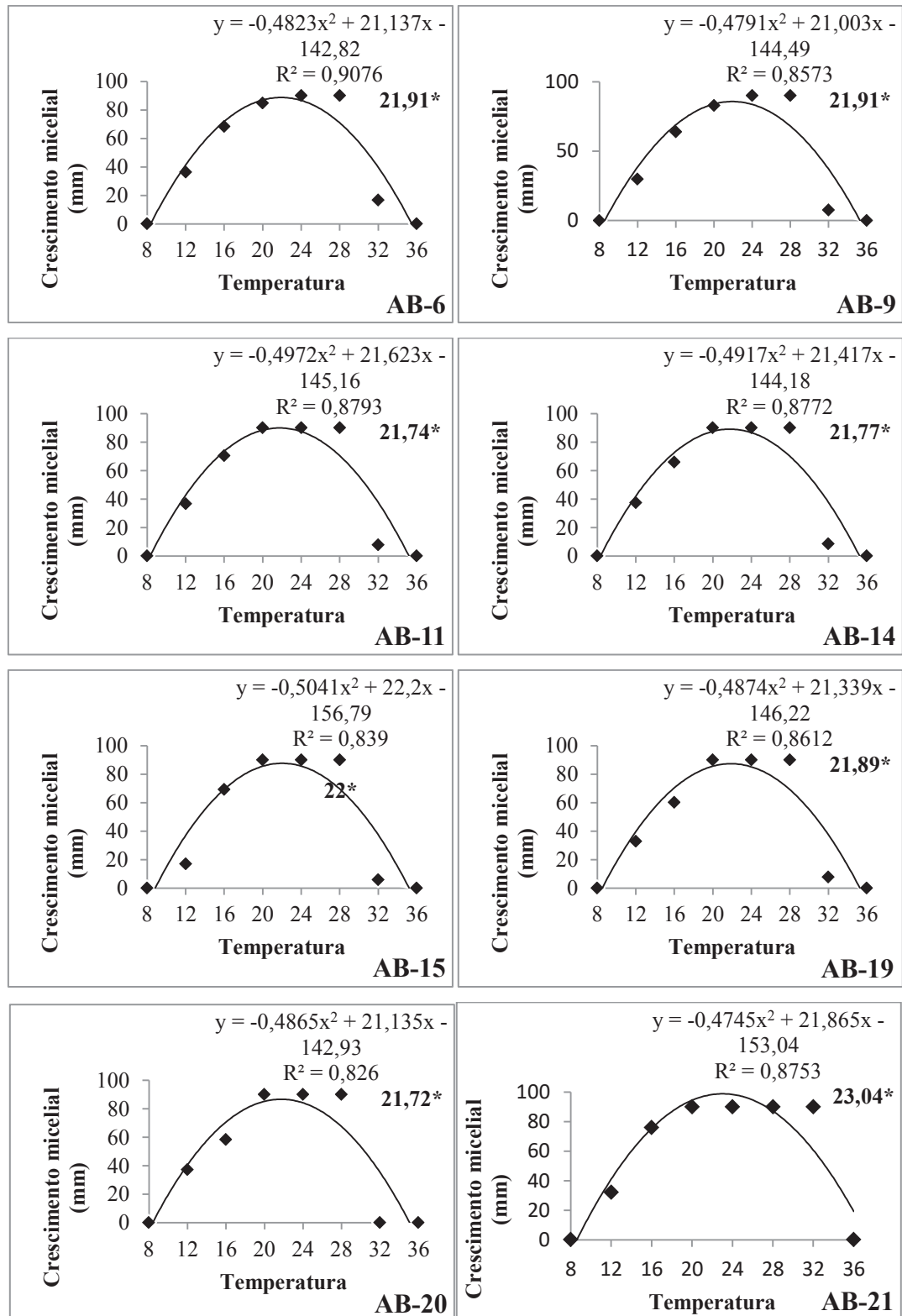


FIGURA 4 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 2 - ABACATEIRO EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(conclusão)

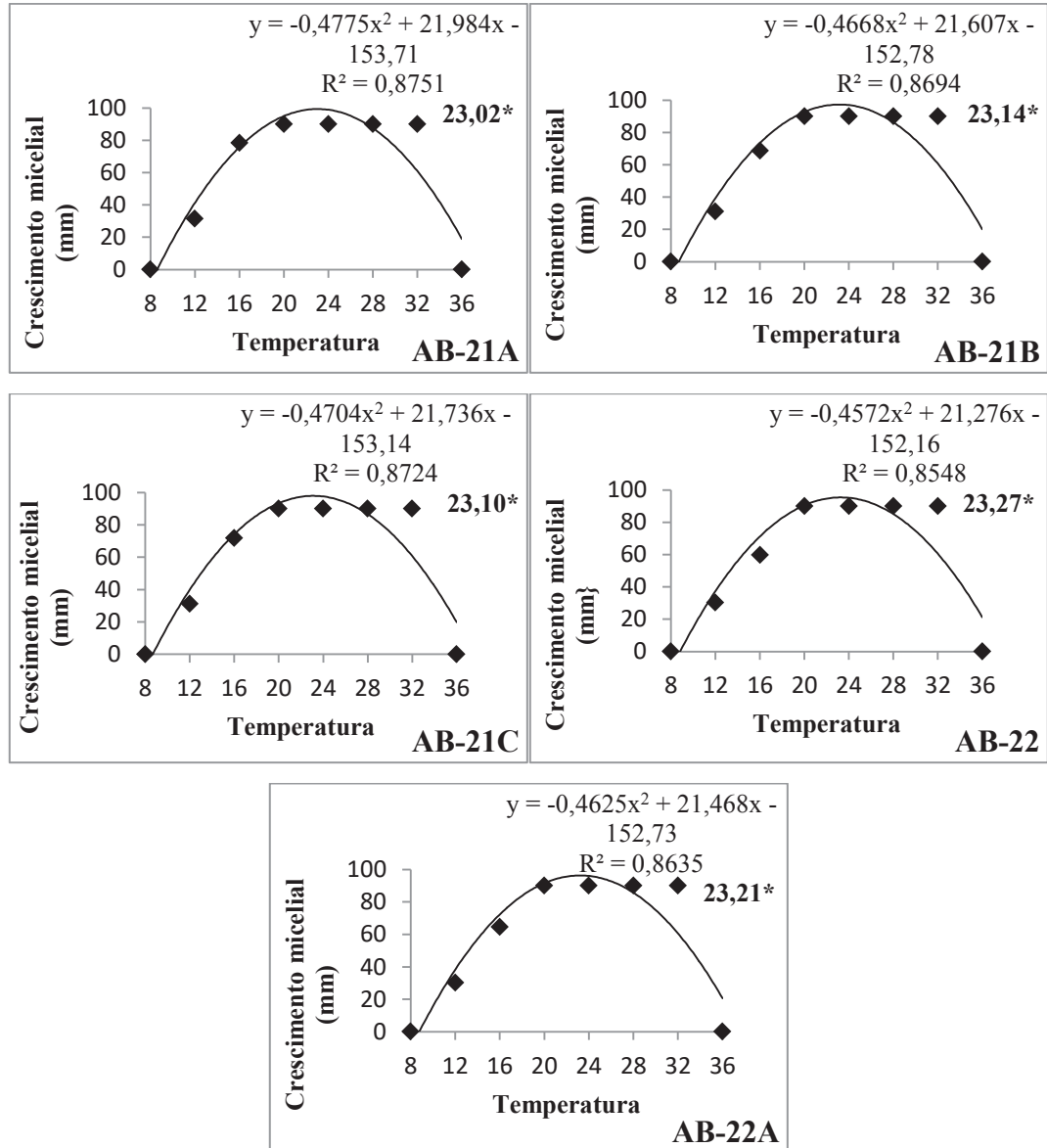


FIGURA 5 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 3 - PLÁTANO EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

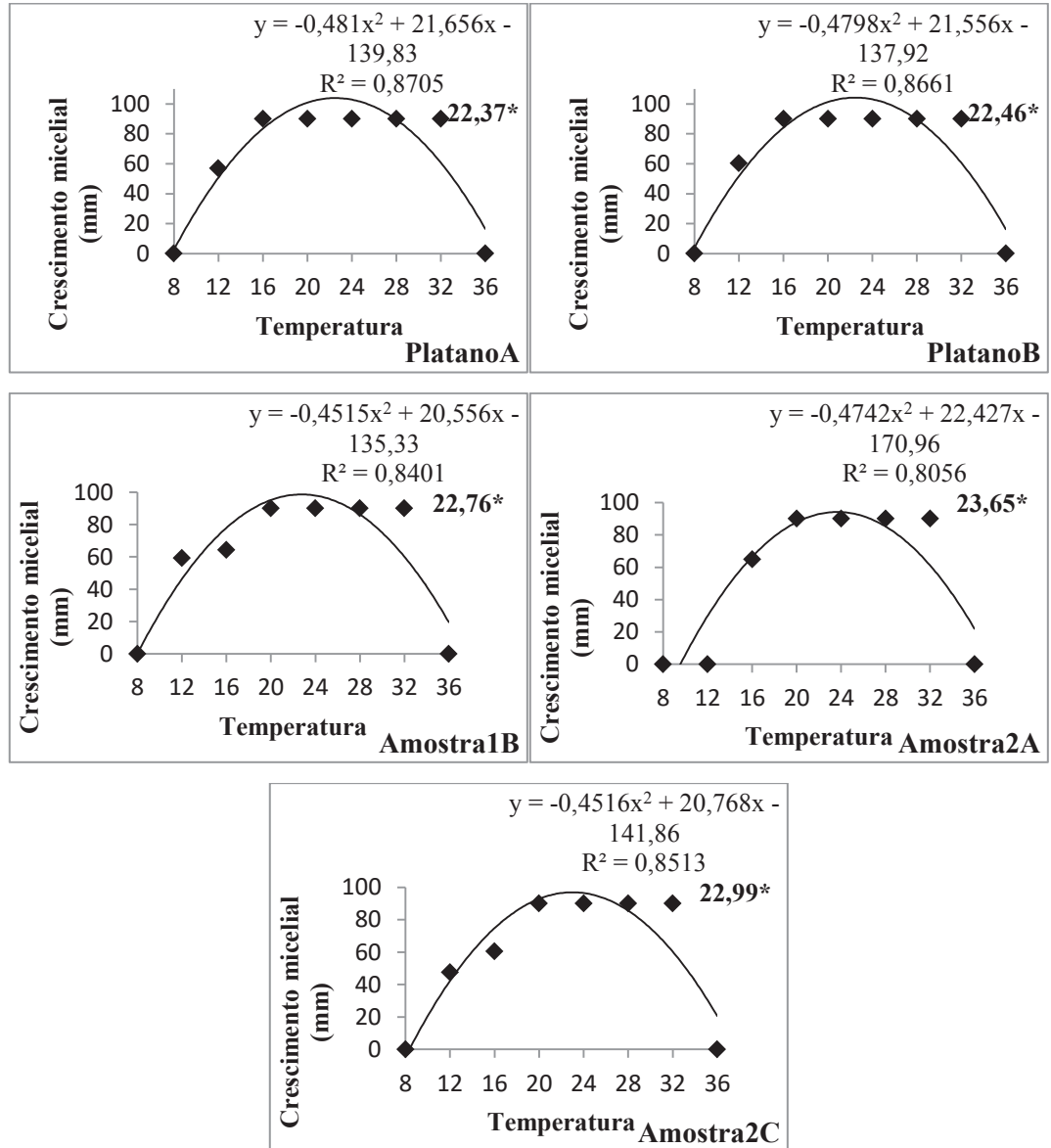


FIGURA 6 – CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 4 – RIZOSFERA DE PLANTAS DA MATA ATLÂNTICA EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(continua)

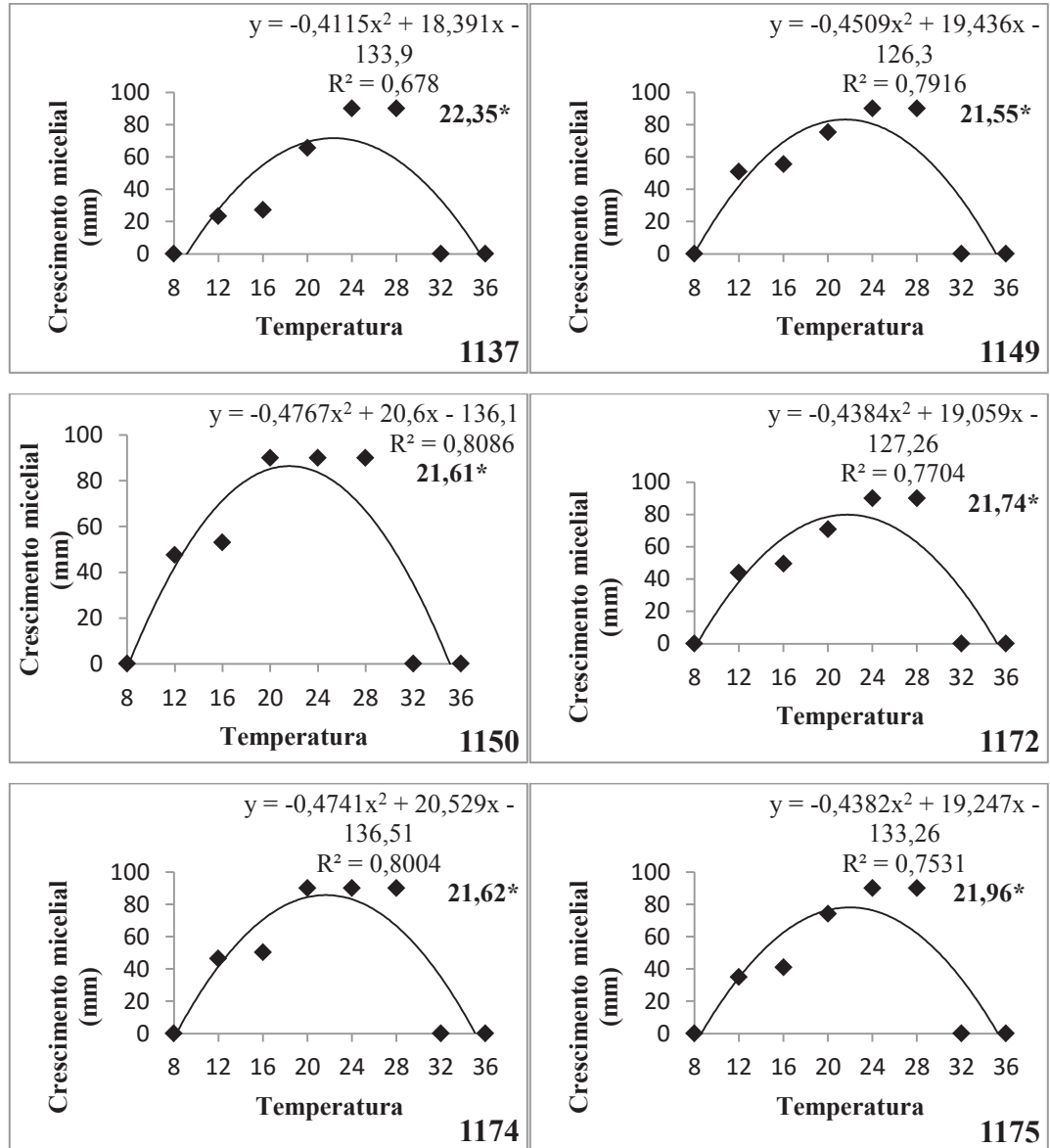
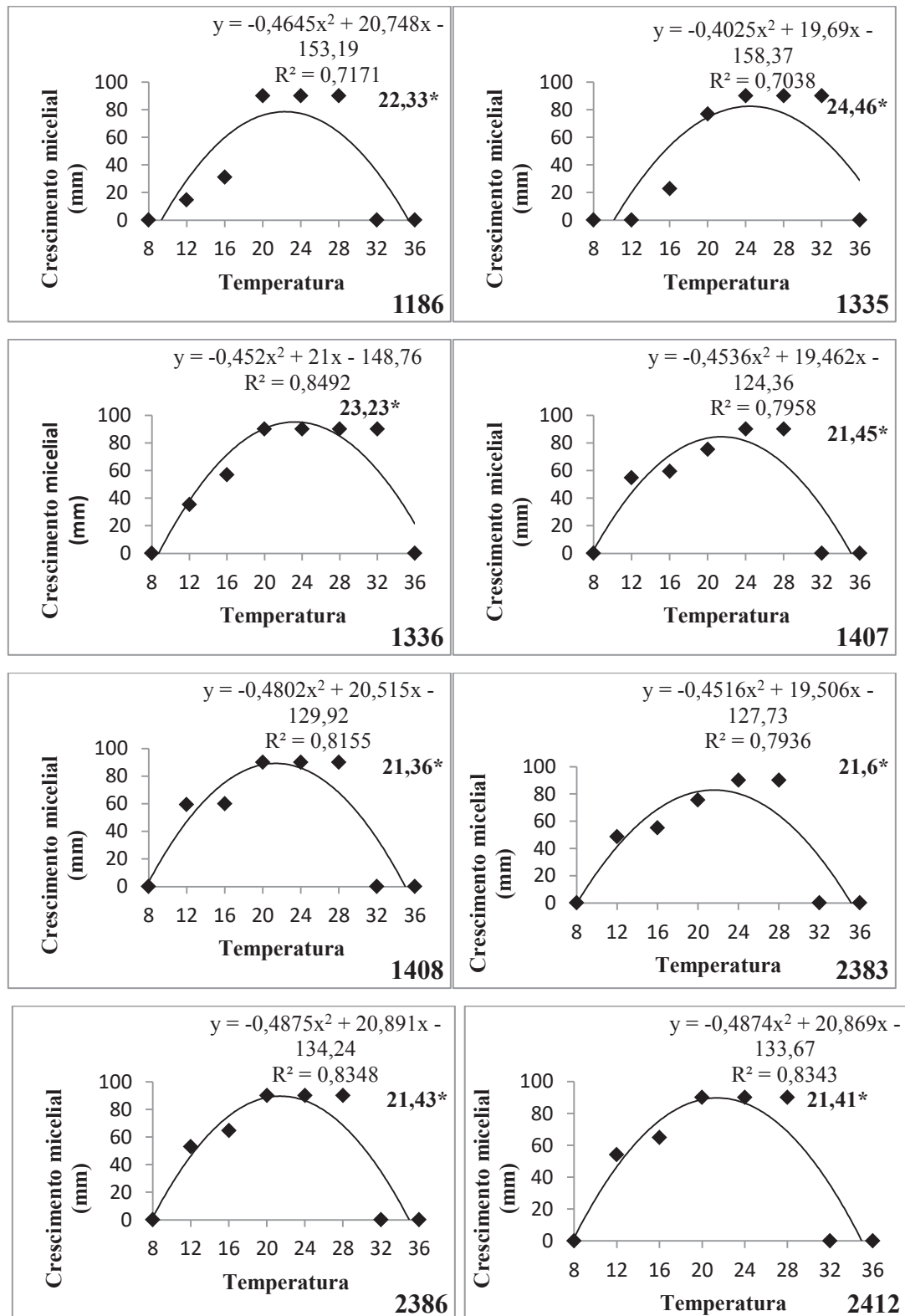


FIGURA 6 – CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DO GRUPO 4 – RIZOSFERA DE PLANTAS DA MATA ATLÂNTICA EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(conclusão)





Os isolados de *P. cinnamomi* produziram esporângios em extrato de solo. Os esporângios apresentaram-se sem papila, persistentes, formados individualmente, com três formas predominantes: elipsoide, globoso e obovoide (FIGURA 7). Observou-se a formação de clamidósporos e estruturas denominadas dilatações, que são um espessamento da hifa em todos os isolados (FIGURA 8). Não foi observada a formação de clamidósporos para os isolados AR-25 e AB-9. Foram consideradas as medidas de comprimento (C) e largura (L) dos esporângios as quais variaram de 22,5 x 17,5 µm até 86,7 x 37,5 µm com média de 41,6 x 27,6 µm e a relação C/L variou de 1,4 a 1,7 nos isolados de araucária. Para os isolados de abacateiro o comprimento e largura dos esporângios variaram de 22,1 x 16,2 µm até 76,5 x 5 µm (média 43,1 x 30,3 µm e relação C/L variou de 1,4 a 1,8. Para os isolados de plátano o comprimento e a largura foram de 16,7 x 12 a 49 x 36,7 µm, com média de 32,7 x 25 µm e relação C/L média de 1,4. Para os isolados de rizosfera os esporângios tiveram uma amplitude de 23,32 x 19 até 37,7 x 59,7 e média de 31,7 x 25,2 µm, com relação C/L de em média 1,3. Os clamidósporos apresentaram-se terminais com diâmetro de 18,8 – 37,5 µm (média de 35,2 µm) e espessura da parede variando de 1,2 – 3,7 µm (média 1,6 µm) para os isolados de araucária. Para os isolados de abacateiro, o diâmetro variou de 30 – 50 µm (média de 38,6 µm) e a espessura da parede variou de 1,25 – 3,75 µm (média 1,93 µm). Para os isolados de plátano o diâmetro variou de 26 a 51,3 µm e a espessura da parede de 1,3 a 4,7 µm. Para os isolados de rizosfera, os clamidósporos apresentaram diâmetro variando de 27,3 – 49,2 µm (com média de 37,5 µm) e espessura média de parede de 2 µm.

Dentre os isolados de araucária, alguns se destacaram pela formação de esporângios ligeiramente maiores em seu comprimento quando comparados aos outros isolados. Os isolados AR-20, AR-23, AR-24 e AR47A apresentaram valores máximos maiores (71,25 mm, 75 mm, 83,75 mm e 65 mm, respectivamente). Nos isolados de abacate também foi possível observar tal comportamento nos isolados AB-1 (70 mm), AB-15 (60 mm), AB-19 (67,5 mm), AB-21A (76,5 mm) e AB22A (72,1mm). Nos isolados de plátano tais valores não foram observados. As características morfológicas dos esporângios e clamidósporos de todos os isolados estão apresentadas na TABELA 3. As medidas médias dos grupos de isolados dos esporângios e clamidósporos dos isolados em comparação às medidas encontradas em descrições prévias para a espécie estão representadas na TABELA 4.

TABELA 3 - DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS ASSEXUADAS DOS ISOLADOS *Phytophthora cinnamomi* DOS GRUPOS 1, 2,3 E 4

(continua)

Isolado	ESPORÂNGIO (µm)			CLAMIDÓSPORO (µm)	
	COMPRIMENTO (C)	LARGURA (L)	C/L	DIÂMETRO	ESPESSURA DA PAREDE
<b>GRUPO 1 – ARAUCÁRIA</b>					
AR-2	22,5 <sup>A</sup> - 32,8 <sup>B</sup> - 55 <sup>C</sup> (±5,9) <sup>D</sup>	17,5- 24,3 - 32,5 (±3,6)	1,4	18,8- 27,8 - 37,5 (±3,2)	1,3- 1,6 - 2,5 (±0,6)
AR-20	28,8- 41,2 - 71,3 (±8,3)	18,8- 27,8 - 46,3 (±4,7)	1,5	23,7- 34,1- 46,2 (±4,7)	1,3- 1,5 - 2,5 (±0,5)
AR-21	31,3- 43,6 - 62,5 (±7,3)	21,3-28,8- 36,25 (±3,8)	1,5	28,8- 38,8 - 50 (±3,8)	1,3- 1,5 - 2,5 (±0,5)
AR-22	25-41-62,5 (±7,4)	17,5-27,6-43,8 (±4,4)	1,5	28,7-34,7-43,8 (±3,1)	1,3-1,6-3,8 (±0,6)
AR-23	32,1-45,1-58,3 (±7,3)	20-28,5-36,4 (±4,5)	1,5	27,5-34,5-42,3 (±3,1)	1,3-1,5-2,1 (±0,7)
AR-24	25-46,7-83,8 (±11,6)	20-29-42,5 (±4,8)	1,6	25-35,4-43,75 (±3,3)	1,3-1,27-2,5 (±0,2)
AR-25	37,5-44,9-62,5 (±5,8)	25-30,2-37,5 (±3,2)	1,5	-	-
AR-26	30-40,3-58,8 (±6,3)	20-27,2-36,3 (±4,2)	1,5	25-30,5-37,5 (±3,4)	1,3 (±0)
AR-27	35,6-41,2-56,2 (±5,6)	18,4-26,4-2- 37,2 (±4,3)	1,5	30-32-37,8 (±3,2)	1,3-1,5-2,5 (±0,6)
AR-30	27,5-42,63-65 (±7,5)	20-29,1-37,5 (±4,2)	1,5	32,5-36,6-43,8 (±2,9)	1,3-1,5-3,8 (±0,6)
AR-31	25-40,9-60 (±6,9)	20-28,7-37,5 (±5,2)	1,4	21,3-32,9-41,3 (±3,4)	1,3 (±0)
AR-32	27,5-39-56,3 (±6,36)	18,8-3,18-40 (±4,5)	1,6	30-32,7-37,5 (±1,9)	1,3 (±0)
AR-33	17,5-25,2-38,8 (±4,9)	28,8-41,5-62,5 (±1,9)	1,7	30-35,5-43,8 (±3,4)	1,3 (±0)
AR-34	25-37,18-52,5 (±3,9)	17,5-23,8-37,5 (±3,8)	1,6	33,8-41,5- 51,3(±4,8)	1,3-2,5-3,8 (±1)
AR-35	32,5-41,1-57,5 (±5,9)	21,3-28,1-37,5 (±4,32)	1,5	27,5-36,1-45 (±3,6)	1,3-1,9-3,8 (±0,8)
AR-36	28,8-40,4-53,8 (±5,7)	18,8-26,9-35 (±3,7)	1,5	30-35,4-40 (±2,7)	1,3-1,6-2,5 (±0,6)
AR-37	30-39,4-62,5 (±7,1)	22,5-27,15- 47,5 (±4,8)	1,5	32,3-38,9-45 (±3,1)	1,3-2,4-2,5 (±0,2)
AR-38	27,5-39-56,3 (±6,4)	18,8-25,2-40 (±4,5)	1,6	30-32,7-37,5 (±1,9)	1,3 (±0)
AR-40	27,5-36,9-52,5 (±5,9)	18,8-23,9-35 (±3,4)	1,6	30-35,4-51,3 (±3,9)	1,3-2-3,8 (±0,8)
AR-40A	26-36,12-50,5 (±5,2)	18-24-35 (±3,6)	1,6	31-35,5-51 (±3,8)	1,3-2-3,8 (±0,8)
AR-41	33,8-44,3-60 (±5,9)	20-28,4-38,8 (±4,4)	1,6	32,5-37,2-42,5 (±2,5)	1,3-1,8-2,5 (±0,6)
AR-41A	32,8-43-60,1 (±5,8)	20-27,9-37,9 (±4,2)	1,6	33,5-36,2-41,5 (±2,4)	1,3-1,8-2,5 (±0,6)
AR-42	31,3-41,1-56,25 (±5,3)	17,5,-26,9- 33,8 (±3,5)	1,5	31,3-36,5-46,3 (±3,2)	1,3-1,7-2,5 (±0,6)
AR-42A	33,8-42,13-52,5 (±4,4)	21,3-27,7-33,8 (±2,7)	1,5	33,8-40,3-50 (±3,5)	1,3-2,2-3,8 (±0,7)

TABELA 3 - DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS ASSEXUADAS DOS ISOLADOS *Phytophthora cinnamomi* DOS GRUPOS 1, 2,3 E 4

(continuação)

Isolado	ESPORÂNGIO (µm)		C/L	CLAMIDÓSPORO (µm)	
	COMPRIMENTO (C)	LARGURA (L)		DIÂMETRO	ESPESSURA DA PAREDE
GRUPO 1 – ARAUCÁRIA					
AR-43	33,8-40,6-52,5 (±4,9)	18,8-27,3-37,5 (±4,3)	1,5	27,5-37,1-42,5 (±2,9)	1,3-1,9-2,5 (±0,6)
AR-43A	27,5-39,4-56,3 (±4,3)	21,3-28,7-37,5 (±3,5)	1,4	27,5-37,8-43,7 (±3,1)	1,3-1,9-3,8 (±0,7)
AR-44	33,8-41,7-56,2 (±4,8)	23,3-29,5-38,8 (±3,9)	1,4	31,3-37,9-42,5 (±2,6)	1,3-1,7-2,5 (±0,60)
AR-44A	33,8-42,6-56,3 (±6,1)	20-25,7-32,5 (±3,3)	1,7	31,3-35,8-41,2 (±2,6)	1,3-1,4-2,5 (±0,4)
AR-45	25,6-45,8-65,1 (±5,2)	18,2-30,9-38,9 (±3,2)	1,5	31-34,2-43,2 (±3,1)	1,3-1,8-3 (±0,3)
AR-45A	24,2-44,7-64 (±6,3)	18,5-29,6-38 (±3,2)	1,5	33-36,2-42,2 (±4,1)	1,3-1,4-3,5 (±0,4)
AR-46	33,8-44,1-58,8 (±6,9)	23,3-28,7-36,3 (±3,9)	1,6	31,3-37,9-42,5 (±2,6)	1,3-1,7-3,8 (±0,7)
AR-46A	62,5-47,8-37,5 (±5,4)	25-31,9-37,5 (±3,1)	1,5	31,3-34,4-37,5 (±2,1)	1,5-1,8-2,5 (±0,7)
AR-47	37,5-45,8-61,5 (±5,3)	23,2-30-37,3 (±3,4)	1,5	32,5-33,5-32,5 (±2,2)	1,3-1,5-2,5 (±0,7)
AR-47A	37,5-47,8-65 (±5,1)	25-31,5-37,5 (±2,9)	1,5	37,5-41,1-50 (±3,4)	1,3-1,4-2,5 (±0,4)
AR-49	30-39,3-53,75 (±4,3)	20-25,5-31,3 (±2)	1,5	35-42,4-50 (±4,9)	1,3-1,4-2,5 (±0,4)
AR-50	30-41,4-52,5 (±4,9)	20-28,2-37,5 (±3,6)	1,5	31,3-37,9-50 (±3,7)	1,3-1,8-2,5 (±0,6)
AR-51	30-39,28-53,8 (±4,3)	20-25,5-31,3 (±2)	1,5	35-42,4-50 (±4,9)	1,3-1,4-2,5 (±0,4)
AR-52	26,3-36,9-47,5 (±5,2)	17,5-25-36,3 (±3,7)	1,5	31,3-35,4-40 (±2,3)	1,3-1,5-2,5 (±0,5)
GRUPO 2 – ABACATEIRO					
AB-1	26,3-45,6-70 (±7,7)	20-31,7-46,3 (±4,5)	1,4	35-39,4-45 (±2,4)	1,3-2,1-2,5 (±0,6)
AB-2	27,5-37,4-50 (±5,4)	18,8-26,3-37,5 (±4,1)	1,4	31,3-37,1-47,5 (±3,5)	1,3-1,4-2,5 (±0,4)
AB-3	27,5-36,3-50 (±5)	17,5-24,9-37,5 (±4,2)	1,4	30-33,3-45 (±3,3)	1,3-1,8-2,5 (±0,6)
AB-5	31,3-38,9-50 (±4,06)	20-26,9-33,8 (±2,8)	1,4	35-40,6-50 (±3,1)	1,3-1,9-2,5 (±0,6)
AB-6	27,5-37,5-56,3 (±5,5)	17,5-25,8-33,8 (±5,5)	1,5	31,3-41,2-50 (±3,6)	1,3-2,1-2,5 (±0,6)
AB-8	31,5-36-50 (±4)	20,2-25-35,5 (±3,1)	1,4	34-41,2-50 (±4)	1,3-2-2,5 (±0,6)
AB-9	32,5-40,4-50 (±4)	21,3-28-35 (±3,5)	1,4	-	-
AB-11	31,3-40,4-52,5 (±5)	20-27-37,5 (±3,4)	1,5	35-38,7-48,8 (±3,1)	1,3-2,1-2,5 (±0,6)
AB-14	27,5-39,1-50 (±4,6)	20-27,9-36,3 (±3,4)	1,4	33,8-37,9-45 (±2,9)	1,2-2,1-2,5 (±0,6)
AB-15	32,5-43,6-60 (±6,4)	23,8-30,2-36,3 (±3,1)	1,4	35-37,4-42,5 (±1,6)	1,2-2-2,5 (±0,6)
AB-19	31,3-45,2-67,5 (±8,2)	20-30,3-41,3 (±4,6)	1,5	31,3-36,1-42,5 (±2,3)	1,2-1,5-2,5 (±0,5)
AB-20	32,5-39,4-53,8 (±4,2)	23,7-27,5-37,5 (±3,4)	1,4	31,3-36,7- (±3,9)	1,3-1,7-2,5 (±0,6)
AB-21	22,1-34,2-53,5 (±8,9)	17,7-25,3-38,5 (±5,8)	1,4	24,1-31-45 (±5)	1,3-1,5-2,5 (±0,5)

TABELA 3 - DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS ASSEXUADAS DOS ISOLADOS *Phytophthora cinnamomi* DOS GRUPOS 1, 2,3 E 4

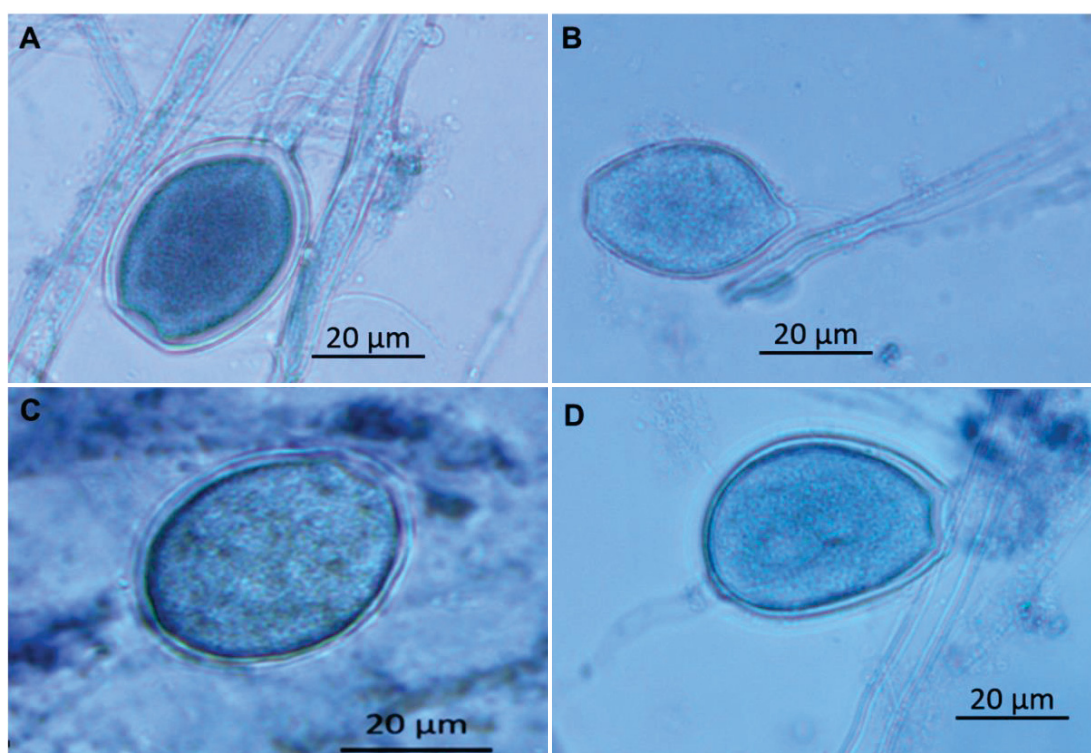
(conclusão)					
Isolado	ESPORÂNGIO (µm)		C/L	CLAMIDÓSPORO (µm)	
	COMPRIMENTO (C)	LARGURA (L)		DIÂMETRO	ESPESSURA DA PAREDE
AB-21A	25,8-49,2-76,5 (±10,7)	21,5-36,7-46,7 (±6)	1,3	24,8-31,6-49,9 (±5,8)	1,5-2,1-2,5 (±0,5)
AB-21B	23-44,2-70 (±8,4)	21-35-41,5 (±5,8)	1,4	24-32,3-48,2 (±5,2)	1,2-1,5-2,5 (±0,6)
AB-21C	30,6-50,7-71,5 (±8,6)	20-36,9-50 (±5,9)	1,4	24,8-31,6-47,5 (±6,8)	1,6-2-2,6 (±0,6)
AB-22	31,2-42,1-58,2 (±7)	19,9-30,3-37,9 (±4,1)	1,4	27-38,4-48,7 (±6,7)	1,6-2-2,5 (±0,4)
AB-22A	23,7-51-72,1 (±10,5)	16,2-34,7-45,2 (±4,7)	1,5	26,2-33,6-43,4 (±4,4)	0,9-2,1-3,4 (±0,7)
<b>GRUPO 3 – PLÁTANO</b>					
PLATANO A	19,3-33,7-47 (±6)	13-25-35,6 (±5)	1,3	30-39,1-49,1 (±4)	1,3-2,5-4,1 (±0,8)
PLATANO B	18,6-30,5-47 (±6)	13-23,2-35,3 (±5)	1,3	27,2-39-48,7 (±5)	1,5-2,5-4,2 (±0,7)
AMOSTRA 1B	17-32,7-49 (±8)	12-24,3-35,5 (±6,1)	1,4	30,5-39,8-49,7 (±4,7)	1,5-2,4-4,7 (±0,9)
AMOSTRA 2A	26,6-36-47,5 (±6,7)	26,4-30,6-34 (±4,3)	1,4	25,5-36,6-47,5 (±6,5)	1,3-2,4-4,6 (±0,8)
AMOSTRA 2C	16,7-30,8-47 (±7,5)	12,4-22-36,7 (±5,7)	1,4	26-38-51,3 (±5,8)	1,5-2,6-3,6 (±0,7)
<b>GRUPO 4 – RIZOSFERA</b>					
1137	25-32-40 (±5,2)	21-24,8-29,3 (±2,8)	1,3	25,5-39-8-49 (±5,8)	2,5
1149	26-33,7-40,4 (±5,4)	21,3-25,8-29,5 (±2,9)	1,3	30-38-50 (±8)	2
1150	24,1-32-41 (±5)	21,1-25-28,7 (±2)	1,3	27,2-37,6-51,2 (±6,5)	2
1172	25,6-33,1-40,2 (±4,5)	20-24,1-30 (±3)	1,4	30-40-48 (±7,8)	2,2
1174	26-32,6-43,2 (±6)	20-26-29,5 (±2,7)	1,3	30-39,8-47,5 (±6,8)	2,6
1175	22-31,2-41,7 (±7)	21-23,5-28 (±2,5)	1,3	27-39-48 (±6)	2
1186	24,5-30-35,1 (±5,1)	20-26,1-30 (±3)	1,1	25-38-49,7 (±5,5)	1,5
1335	23,1-30-33 (±4,25)	21,3-26-31 (±3)	1,3	27-33,6-51 (±6,9)	1,8
1336	22,1-31-37,5 (±6,3)	23-24-30 (±3,2)	1,3	27-33,6-53 (±6,5)	1,6
1407	21-30,8-34,2 (±5,3)	16-25,8-31,2 (±2,5)	1,2	26-37-49 (±7)	2
1408	22,3-32-36,4 (±6)	17-26-33 (±4,1)	1,2	24-32,3-47,5 (±8,4)	2,1
2383	21-30,9-36,7 (±5,2)	15,4-25-28,8 (±3,9)	1,2	24,8-38-51,2 (±6,9)	1,4
2386	22,3-31,2-34,6 (±6,3)	14,8-24,6-28,9 (±4,2)	1,3	29-38-48 (±7)	2
2412	21,5-31-35 (±5)	15-26,4-28 (±3,6)	1,2	30-37-47 (±7,2)	1,8

LEGENDA: <sup>A</sup> Limite inferior; <sup>B</sup> Média de 50 oósporos; <sup>C</sup> Limite superior; <sup>D</sup> Desvio-padrão. – estrutura não observada

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS ESTRUTURAS ASSEXUADAS DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO, RIZOSFERA E DA LITERATURA.

Característica	Araucária	Abacate	Plátano	Rizosfera	<i>P. cinnamomi</i> (Frezzi, 1950)	<i>P. cinnamomi</i> (Waterhouse, 1963)	<i>P. cinnamomi</i> (Gallegly, 2008)
Nº de isolados	38	18	5	14	8	2	-
Hifa	Coralóide	Coralóide	Coralóide	Coralóide	-	Coralóide	Coralóide
Dilatações	Esféricas	Esféricas	Esféricas	Esféricas	Esféricas	Esféricas	-
Esporulação	Meio líquido	Meio líquido	Meio líquido	Meio líquido	Extrato de solo	Meio líquido	-
Esporângio	Não papilado	Não papilado	Não papilado	Não papilado	Não papilado	Não papilado	Não papilado
Amplitude (C x L) (µm)	29,7-58,3 x 19,9-37,2	38-56,9 x 19,8-38	19,64-47,5 x 15,6-35,42	23,32-37,79 x 19,06-29,71	17-54 x 23-84	-	-
Comprimento x Largura (média)	41,1 x 27,5	41,2 x 28,5	32,74 x 25,02	37,75 x 25,23	49 x 26,5	53 x 33	60 x 34
Relação (C/L) (média)	1,5	1,5	1,4	1,3	1,84	-	-
Formas distorcidas	+	+	+	+	-	-	+
Caducidade	Persistente	Persistente	Persistente	Persistente	Persistente	Persistente	Persistente
Clamidósporo	Abundante	Infrequente	Abundante	Abundante	Abundante	Presente	Abundante
Amplitude (média)	29,98-44,23	30,9-47,31	27,84-49,26	27,39-49,29	15-59	31-50	-
Diâmetro (µm) (média)	36,36	37	38,5	37,51	38,5	41	-
Espessura da parede (µm)	1,6	1,8	2,5	2	-	-	-

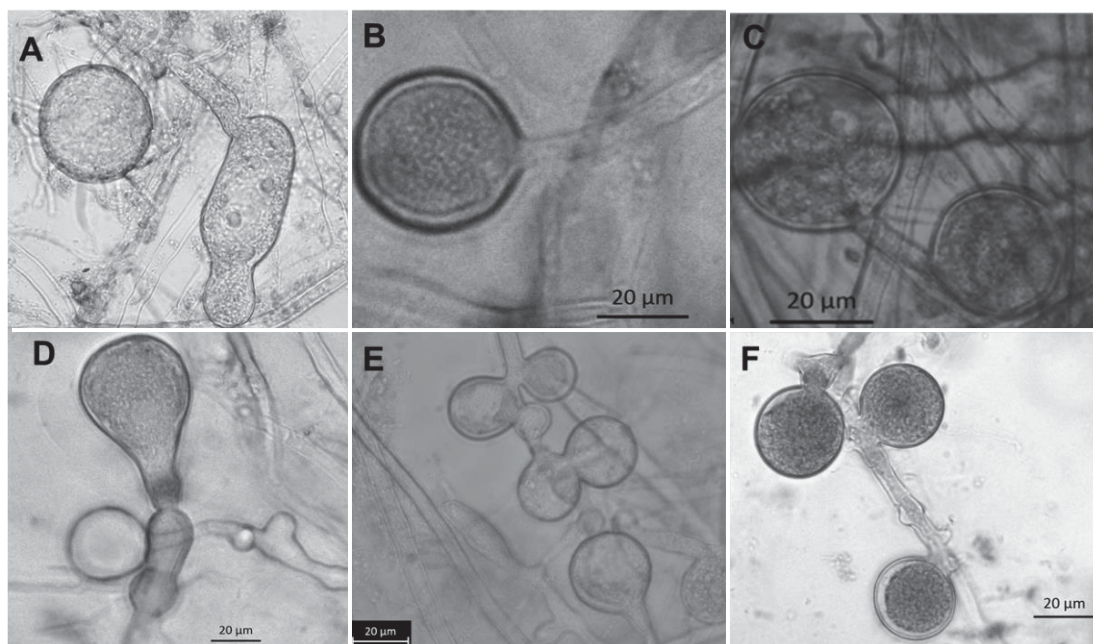
FIGURA 7 - CARACTERÍSTICAS DE ESPORÂNGIOS PERSISTENTES E NÃO-PAPILADOS DE *Phytophthora cinnamomi*. A (AR21 – GRUPO1), B (AB21 – GRUPO2), C (-GRUPO3) E D (2383 – GRUPO4). (SOB AUMENTO DE 400X)



FONTE: O autor (2018).



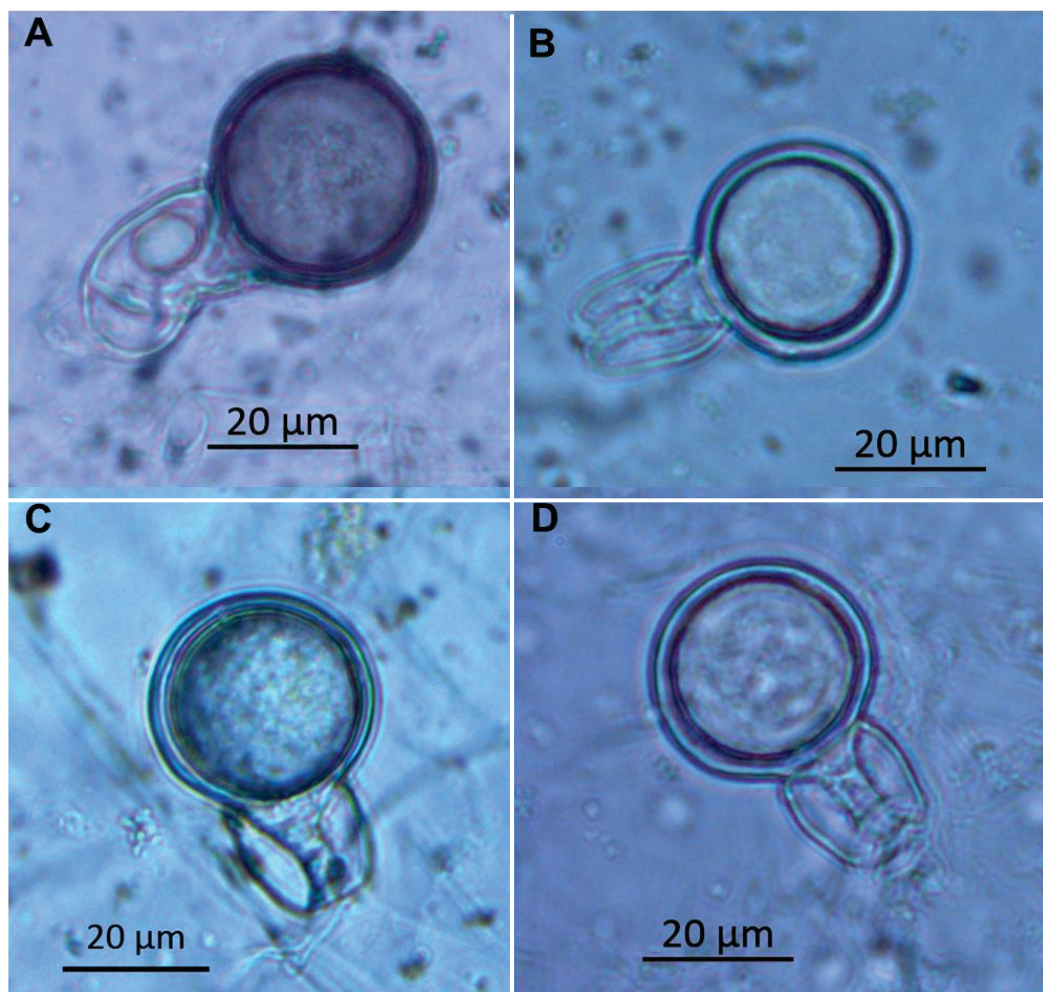
FIGURA 8- CARACTERÍSTICAS DE CLAMIDÓSPOROS E DILATAÇÕES DE *Phytophthora cinnamomi*. A (AR-21 – GRUPO 1), B (AB-11 – GRUPO 2), C (Amostra1B – GRUPO 3) – CLAMIDÓSPOROS GLOBOSOS. D (AR-40 – GRUPO 1), E (AB-15 GRUPO 2), F (PlatanoB-GRUPO 3) – DILATAÇÕES ESFÉRICAS.(AUMENTO DE 400X)



FONTE: O autor (2017).

Os isolados foram categorizados como heterotáticos e pertencentes ao tipo de compatibilidade A2. Houve formação das estruturas sexuadas em todos os isolados, quando pareados com espécie do tipo de compatibilidade A1. Os oósporos dos isolados apresentaram-se apleróticos, sem ornamentações nas paredes, e de anterídio anfígeno (FIGURA 9).

FIGURA 9 – DETALHE DE OÓSPOROS APLERÓTICOS DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi*. A (AR25 - GRUPO1), B (AB22 - GRUPO2), C (AMOSTRA2C - GRUPO3) E D (1149 - GRUPO 4). (AUMENTO DE 400X)



Fonte: O autor (2017).

O diâmetro destas estruturas variou de 20 a 32,5  $\mu\text{m}$  (média de 25,2  $\mu\text{m}$ ) para os isolados de araucária e 10 a 31,25  $\mu\text{m}$  (média de 24,74  $\mu\text{m}$ ) para os isolados de abacateiro. Para os isolados de plátano variou de 18 a 30  $\mu\text{m}$  com média de 24,46  $\mu\text{m}$ , para os isolados provenientes de rizosfera variou de 21,07 a 26,20 com média de 24,26  $\mu\text{m}$ . Neste critério avaliado, não houve uma variação proeminente entre isolados ou mesmo entre grupos de isolados, permanecendo todos com medidas similares. As características das estruturas sexuais de todos os isolados estão representadas na TABELA 5. As medidas médias dos grupos de isolados relacionadas à estrutura sexual estão representadas na TABELA 6.



TABELA 5 - DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS SEXUADAS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DOS GRUPOS 1,2,3 E 4

(continua)

ISOLADOS	DIÂMETRO (µm)	
	OOGÔNIO	OÓSPORO
<b>GRUPO 1 - ARAUCÁRIA</b>		
AR-2	22,5 <sup>A</sup> - 26,7 <sup>B</sup> - 33,8 <sup>C</sup> (±2,1) <sup>D</sup>	21,3- 24,8 - 31,3 (±2)
AR-20	23,8- 27,8 - 31,3 (±1,9)	21,3-25,5 - 28,8 (±1,9)
AR-21	22,5- 26,8- 31,3 (±2,1)	21,3- 24,9- 28,8 (±1,8)
AR-22	25-27,9-30 (±1,8)	22,5-26,1-28,8 (±1,9)
AR-23	24-26,9-31,3 (±1,9)	22,5-25,6-30 (±1,9)
AR-24	22,5-27,1-30 (±1,8)	20-25-27,5 (±1,8)
AR-25	25-28,5-31,3 (±1,7)	22,5-26,4-30 (±1,7)
AR-26	22,5-25,8-28,8 (±1,3)	21,3-24,5-27,5 (±1,3)
AR-27	22-25-30 (±2,3)	21,3-26-28,5 (±1,4)
AR-30	25-27,6-28,8 (±1,5)	22,5-25-27,5 (±1,3)
AR-31	25-27,1-31,3 (±1,7)	22,5-25,2-28,8 (±1,7)
AR-32	23,8-26,4-31,3 (±1,8)	21,3-24,6-28,8 (±1,7)
AR-33	25-27,9-28,8 (±1,2)	22,5-25,7-27,5 (±1,4)
AR-34	25-28,9-32,5 (±1,9)	22,5-27,1-32,5 (±2)
AR-35	23,3-27,18-28,8 (±1,5)	22,5-25,4-27,5 (±1,4)
AR-36	22,5-27,7-31,3 (±1,8)	21,3-26,5-30 (±1,8)
AR-37	22,5-27,1-31,3 (±1,8)	21,3-25,3-30 (±1,7)
AR-38	21,3-26-31,3 (±1,3)	22,5-25-30,2 (±1,5)
AR-40	22,5-26,8-31,3 (±1,9)	21,3-25,3-30 (±1,9)
AR-40A	21-26,1-31,3 (±1,3)	21-23,2-30 (1,8)
AR-41	23,3-26,9-30 (±1,6)	22,5-25,7-28,8 (±1,6)
AR-41A	22,5-25-31,2 (±1,4)	22-25-28,8 (±1,6)
AR-42	23,3-27,35-30 (±1,5)	22,5-25,6-28,8 (±1,3)
AR-42A	25-26,5-30 (±1,4)	23,8-25,1-28,8 (±1,4)
AR-43	25-26,7-28,8 (±1,3)	22,5-25-27,5 (±1,1)
AR-43A	23,8-26,1-30 (±1,4)	21,3-24,3-27,5 (±1,2)
AR-44	22,5-26-28,8 (±1,5)	21,3-24,1-26,3 (±1,4)
AR-44A	25-27,3-30 (±1,3)	23,8-25,8-28,8 (±1,3)

TABELA 5 - DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS SEXUADAS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DOS GRUPOS 1,2,3 E 4

(continuação)

ISOLADOS	DIÂMETRO (µm)	
	OOGÔNIO	OÓSPORO
AR-45	23-25-28,7 (±1,5)	20-24,2-27 (±1,3)
AR-45A	24-26,7-30,5 (±1,6)	20,3-23-26 (±1,2)
AR-46	25-26-28,8 (±1)	22,5-24,5-26,3 (±1,1)
AR-46A	25-26,2-28,8 (±1,3)	22,5-24,4-26,3 (±1,3)
AR-47	25-27,1-30 (±1,7)	22,5-25,6-28,8 (±1,7)
AR-47A	25-26,2-28,8 (±1,4)	22,5-24,5-27,5 (±1,3)
AR-50	21,3-26,2-30 (±1,66)	20-24,9-28,8 (±1,66)
AR-51	25-26,1-28,8 (±1,2)	23,8-24,8-27,5 (±1,2)
AR-52	25-26,8-30 (±1,3)	23,8-25,6-28,8 (±1,3)
<b>GRUPO 2 - ABACATE</b>		
AB-1	25-27,8-30 (±1,5)	23,8-26,6-28,8 (±1,5)
AB-2	25-27-28,8 (±1,5)	23,8-25,8-27,5 (±1,5)
AB-3	25-26,2-58,8 (±1,1)	22,5-24,3-26,3 (±1,1)
AB-5	22,5-26,7-33,8 (±2,1)	21,3-24,8-31,3 (±2)
AB-6	25-26,4-28,5 (±1,5)	22,5-24,5-26,3 (±1,2)
AB-8	22-25,9-28,9 (±1,2)	22,3-24,5-26 (±1,3)
AB-9	22,5-25,8-28,8 (±1,4)	20-23,9-26,3 (±1,4)
AB-11	25-26,7-28,8 (±1,4)	23,3-25,5-27,5 (±1,4)
AB-14	25-25,9-28,8 (±1,2)	22,5-24-26,3 (±1,1)
AB-15	25-26,7-28,8 (±1,3)	22,5-25,3-27,5 (±1,3)
AB-19	23,8-26,3-28,8 (±1,5)	22,5-24,9-27,5 (±1,4)
AB-20	21,3-25,2-27,5 (±1,3)	20-23,7-25 (±1,1)
AB-21	22-26-28 (±1,5)	20,1-24-25 (±1,1)
AB-21A	23-25-27,5 (±1,1)	21,3-23-25,6 (±1,2)
AB-21B	22,1-24-28,8 (±1,3)	22,1-25-26,3 (±1,6)
AB-21C	22,1-23,2-27,1 (±1,5)	21-24,8-25,3 (±1,5)
AB-22	20,1-24-5-29,9 (±1,3)	20-25,2-26 (±1,5)
AB-22A	22,1-23,2-27,1 (±1,3)	21-25-28 (±1,2)

TABELA 5 - DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS SEXUADAS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DOS GRUPOS 1,2,3 E 4

(conclusão)

ISOLADOS	DIÂMETRO ( $\mu\text{m}$ )	
	OOGÔNIO	OÓSPORO
<b>GRUPO 3 - PLÁTANO</b>		
PLATANO A	18-24,1-28 ( $\pm 2$ )	22,9-28-32 ( $\pm 2$ )
PLATANO B	19,2-24-28,2 ( $\pm 2$ )	23,8-29-33 ( $\pm 2$ )
AMOSTRA 1B	20,3-24-27 ( $\pm 2$ )	25,5-29-32 ( $\pm 2$ )
AMOSTRA 2A	20,1-24,8-30 ( $\pm 2$ )	23-29,9-32,9 ( $\pm 2$ )
AMOSTRA 2C	22-25,4-29,5 ( $\pm 2$ )	26,7-30-33,9 ( $\pm 2$ )
1137	22-25,1-27,7 ( $\pm 1,4$ )	21,3-24,2-28,1 ( $\pm 2$ )
1149	23-25,2-30 ( $\pm 1,5$ )	21,2-25,3-27,6 ( $\pm 1,2$ )
1150	21,3-26-28,4 ( $\pm 1,6$ )	20-24-26,5 ( $\pm 1,5$ )
1172	23,1-24,3-28,5 ( $\pm 1,7$ )	22-23-25 ( $\pm 1,6$ )
1174	22,6-28,3-27,6 ( $\pm 2$ )	21-26-27 ( $\pm 1,8$ )
1175	22,1-25-28 ( $\pm 1,8$ )	20,3-23-25 ( $\pm 2$ )
1186	23-25,7-27 ( $\pm 1,3$ )	21,4-24-26,1 ( $\pm 1,3$ )
1335	22,8-26-29,3 ( $\pm 1,4$ )	21,2-22,1-28,2 ( $\pm 1,4$ )
1336	23,5-29-30,1 ( $\pm 1,6$ )	23-22,2-27,5 ( $\pm 1,2$ )
1407	23,4-26,7-32 ( $\pm 1,5$ )	22,5-24,5-26 ( $\pm 1,3$ )
1408	21-25,8-28,4 ( $\pm 1,3$ )	21,2-24-25 ( $\pm 1,5$ )
2383	22-25,9-28,6 ( $\pm 1,4$ )	20,7-26-25 ( $\pm 1,3$ )
2386	23,5-25,7-27,5 ( $\pm 1,3$ )	21,2-24-26,2 ( $\pm 2$ )
2412	22-24-30 ( $\pm 1,3$ )	18-24,3-24,5 ( $\pm 1,3$ )

LEGENDA: <sup>A</sup> Limite inferior; <sup>B</sup> Média de 50 oósporos; <sup>C</sup> Limite superior; <sup>D</sup> Desvio-padrão. – estrutura não observada

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS ESTRUTURAS SEXUADAS DE *Phytophthora cinnamomi* DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO, RIZOSFERA DO BRASIL PAREADOS COM *P. frigida* E DA LITERATURA.

Característica	Araucária	Abacate	Plátano	Rizosfera	<i>P. cinnamomi</i> (Waterhouse, 1963)	<i>P. cinnamomi</i> (Gallegly, 2008)
Nº de isolados	38	18	5	14	2	-
Oogônio						
Amplitude (µm)	23,71-0- 30,53	23,28-30,07	24,38-32,76	22,52-25,79	-	-
Média (µm)	26,86	25,73	29,18	25,91	40	40
Oósporo						
Amplitude (µm)	22,19-28,65	21,32-26,86	19,92-28,59	21,07-26,2	-	-
Média	25,15	24,66	24,46	24,26	-	35
Anterídio	Anfígeno	Anfígeno	Anfígeno	Anfígeno	-	Anfígeno
Tipo de compatibilidade	Heterotático	Heterotático	Heterotático	Heterotático	Heterotático	Heterotático

### 3.3.2 Caracterização molecular

A caracterização molecular dos isolados sequenciados de araucária, abacateiro, plátano e da rizosfera permitiu a identificação destes como pertencentes à espécie *P. cinnamomi*. Os fragmentos amplificados apresentaram 800-900 pb e 400–500 pb para as regiões ITS e COX, respectivamente. A comparação das sequências da região ITS-5.8S do rDNA e do gene COX dos isolados deste estudo com sequências dessa região gênica disponíveis no *Phytophthora*-ID para espécies de *Phytophthora* revelou maior similaridade com a espécie *P. cinnamomi*. Para a região ITS os índices de similaridade variaram de 93 a 100% de similaridade, enquanto que para a região COX, os índices variaram de 85 a 100%. Para o isolado de araucária AR25 a região ITS revelou 91% de similaridade com *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* e 90% com *P. cinnamomi* var. *parvispora*. A região COX revelou 88% de similaridade com as sequências de *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* e 86% com *P. cinnamomi* var. *parvispora*. Para o isolado de plátano PlatanoA, resultado similar foi verificado sendo na região ITS sua sequência 95% similar com *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* e 93% com *P. cinnamomi* var. *parvispora* (TABELA 7).

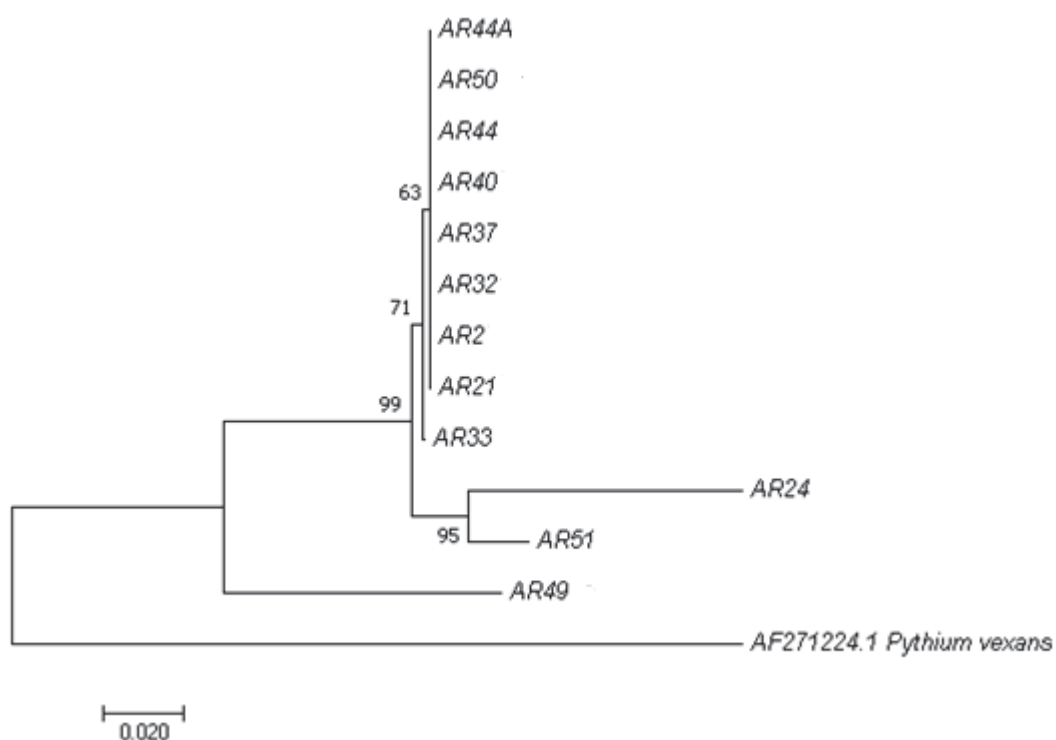
TABELA 7 - SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DE ARAUCÁRIA, ABACATEIRO, PLÁTANO E RIZOSFERA MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DE PORÇÕES E DAS REGIÕES ITS1, ITS2 E DO GENE COX DO DNA RIBOSSOMAL COM SEQUÊNCIAS DO PHYTOPHTHORA-ID

Isolado	ITS	COX
AB1	99% <i>P. cinnamomi</i>	96% <i>P. cinnamomi</i>
AB9	100% <i>P. cinnamomi</i>	98% <i>P. cinnamomi</i>
AB21A	100% <i>P. cinnamomi</i>	99% <i>P. cinnamomi</i>
AB22	99% <i>P. cinnamomi</i>	99% <i>P. cinnamomi</i>
	98% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	
AR24	100% <i>P. cinnamomi</i>	84% <i>P. cinnamomi</i>
	98% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	
AR25	97% <i>P. cinnamomi</i>	88% <i>P. cinnamomi</i>
	96% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	86% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>
AR33	100% <i>P. cinnamomi</i>	88% <i>P. cinnamomi</i>
	98% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	
AR51	97% <i>P. cinnamomi</i>	85% <i>P. cinnamomi</i>
		82% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>
1149	99% <i>P. cinnamomi</i>	99% <i>P. cinnamomi</i>
2383	97% <i>P. cinnamomi</i>	85% <i>P. cinnamomi</i>
2386	99% <i>P. cinnamomi</i>	100% <i>P. cinnamomi</i>
	98% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	
AB11	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
AB19	99% <i>P. cinnamomi</i>	-
AB21C	99% <i>P. cinnamomi</i>	-
AB22	97% <i>P. cinnamomi</i>	-
AB22A	99% <i>P. cinnamomi</i>	-
	98% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	
AB11	99% <i>P. cinnamomi</i>	-
AR2	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
AR21	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
AR32	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
AR37	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
AR40	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
AR44	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
AR44A	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
AR49	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
AR50	100% <i>P. cinnamomi</i>	-
PLATANO1B	99% <i>P. cinnamomi</i>	-
	98% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	
PLATANO A	95% <i>P. cinnamomi</i>	-
	93% <i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	

### 3.3.3 Análise Filogenética

A análise filogenética revelou diferenças dentro da população de isolados de cada grupo e diferenças entre os grupos. Baseadas na região ITS foram realizadas análises para os o grupo de isolados de araucária, para o grupo de abacate e análise de todos os isolados sequenciados dos quatro grupos de hospedeiros. A Figura 10 mostra a separação de dois cladros principais, sendo um deles com o valor de bootstrap de 99. A análise dos isolados do grupo de araucária revelou a separação dos isolados AR24, AR49 e AR51, dentro deste grupo de hospedeiros com o bootsrap de 95.

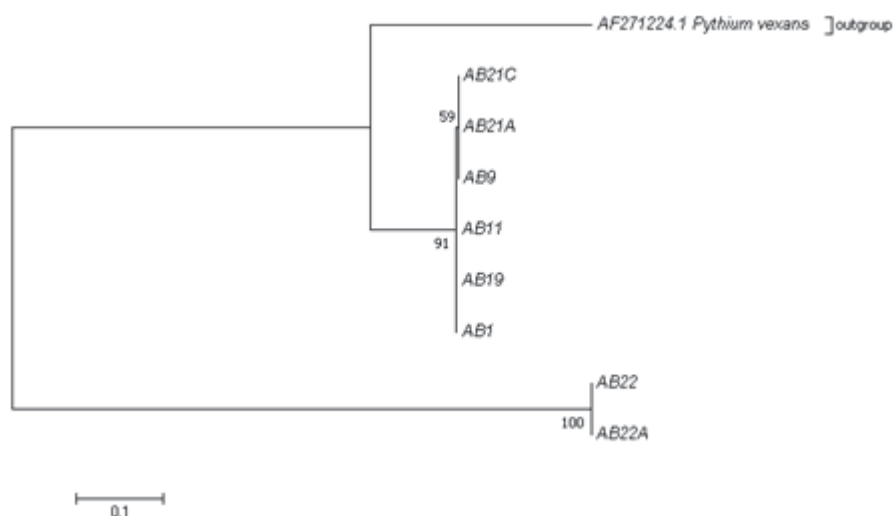
FIGURA 10 - ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA UTILIZANDO A REGIÃO ITS PARA UM CONJUNTO REPRESENTATIVO DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DE ARAUCÁRIA. VALORES DE BOOTSTRAP ESTÃO REPRESENTADOS NOS RAMOS.



FONTE: O autor (2018).

A análise do grupo de abacate revelou a separação dos isolados AB22 e AB22A com bootstrap de 100 do restante dos isolados deste grupo. A Figura 11 mostra este agrupamento.

FIGURA 11 - ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA UTILIZANDO A REGIÃO ITS PARA UM CONJUNTO REPRESENTATIVO DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DE ABACATE OS VALORES DE BOOTSTRAP ESTÃO REPRESENTADOS NOS RAMOS.

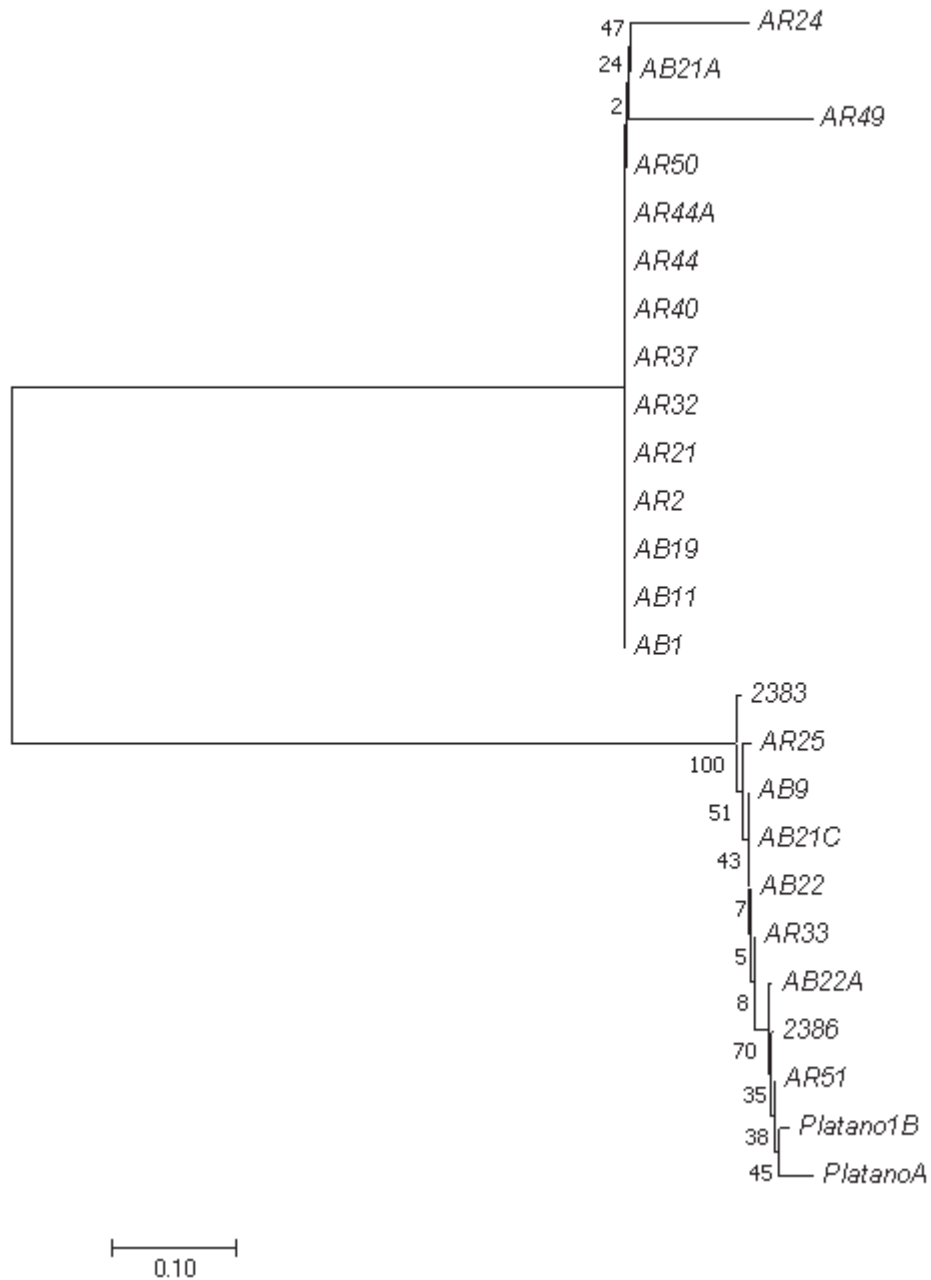


FONTE: O autor (2018).

A árvore gerada para a região ITS com os isolados de todos os grupos revelou a separação de dois agrupamentos diferentes de isolados com valor de bootstrap de 100 (FIGURA 12). O primeiro clado agrupou a maior parte dos isolados de araucária e quatro isolados de abacate, enquanto que o segundo clado agrupou os demais grupos de isolados e três isolados de araucária. No primeiro clado constam os isolados que apresentaram de 99 a 100% de similaridade com as sequências de *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* depositadas no *Phytophthora*-ID. Já no segundo clado estão os isolados que apresentaram similaridade equivalente para *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* e *P. cinnamomi* var. *parvispora*.



FIGURA 12 - ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA UTILIZANDO A REGIÃO ITS PARA UM CONJUNTO REPRESENTATIVO DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO E RIZOSFERA. OS VALORES DE BOOTSTRAP ESTÃO REPRESENTADOS NOS RAMOS.

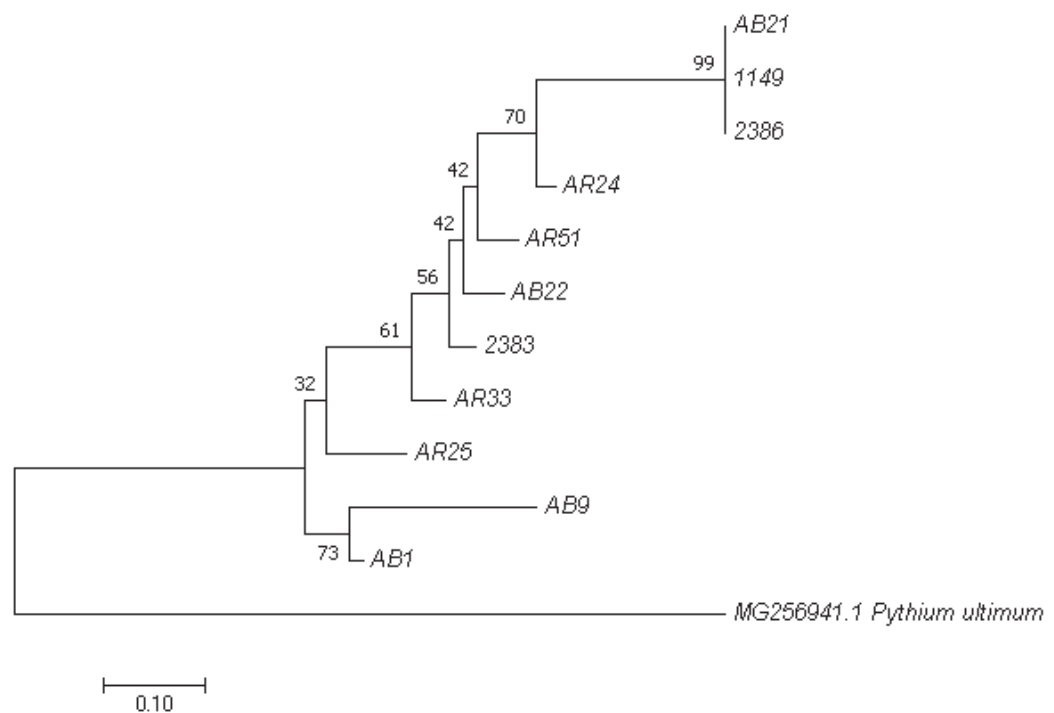


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Isolados de araucária (AR), isolados de abacate (AB), isolados de plátano (Platano), isolados de rizosfera (2383, 2386).

A partir do gene COX, houve separação dos isolados AB21, 2383, 1149 dos outros isolados com bootstrap de 99 e dos isolados AB1 e AB9 com bootstrap de 73 (FIGURA 13).

FIGURA 13- ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA UTILIZANDO OS GENES COX1 E COX2 PARA UM CONJUNTO REPRESENTATIVO DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DE ARAUCÁRIA, ABACATE, PLÁTANO E RIZOSFERA. OS VALORES DE BOOTSTRAP ESTÃO REPRESENTADOS NOS RAMOS.



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Isolados de araucária (AR), isolados de abacate (AB), isolados de rizosfera (1149, 2383, 2386).

### 3.3.4 Caracterização patogênica

No teste de patogenicidade os isolados causaram a morte das mudas de araucária (FIGURA 14) excetuando-se o isolado AR-27.

FIGURA 14 - TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE ARAUCÁRIA. A - MUDA COM SINTOMA DE MURCHA DA PONTEIRA APÓS 21 DIAS, EM B MUDA COM AMARELECIMENTO QUASE TOTAL APÓS 28 DIAS.



FONTE: O autor (2017).

Doze isolados apresentaram 100% de incidência nas mudas, sendo que quatro destes (1149, AB-9, AR-33 e AR-35) causaram a morte da planta 14 dias após a instalação do teste, quatro (2383, 2386, AB-5, AR-25) causaram morte da planta 21 dias após a instalação do teste. Os isolados foram agrupados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) em relação à porcentagem de incidência nas mudas (TABELAS 8 e 9). O grupo de isolados de araucária apresentou maior incidência, a enquanto que o grupo de isolados de plátano apresentou incidência igual ou menor a 40%.

TABELA 8 - INCIDÊNCIA (%) DE PLANTAS MORTAS DE ARAUCÁRIA APÓS 91 DIAS DE INOCULAÇÃO de *Phytophthora cinnamomi*.

Isolados		Incidência (%) 91 D.A.I.						
		0%	20%	40%	60%	80%	100%	
Testemunha								
Araucária	AR27	AR26 AR31	AR2 AR36 AR38 AR40 AR41A AR46 AR47 AR50 AR51	AR30				
				AR32				
				AR40A	AR21			
				AR34	AR23		AR20	
				AR42	AR37		AR22	
				AR41	AR43		AR24	
				AR42A	AR45A		AR25	
				AR43A	AR46A		AR33	
				AR44	AR47A		AR35	
				AR44A	AR49			
				AR45				
				AR52				
				AB3				
				AB14	AB11		AB5	
				AB21B	AB21		AB9	
AB21C	AB21A							
AB22								
Abacate	-	AB1	AB8					
		AB2	AB15					
		AB6	AB20					
		AB19	AB22A					
Plátano	-	PlatanoA	PlatanoB					
		Amostra2C	Amostra1B	-	-	-		
		Amostra2A						
Rizosfera	-	-		1172	1172		1149	
				1137	1174	1174		2383
				1175	1186	1186		2386
				1336	1407	1407		2412
				1408	1408			



TABELA 9 - INCIDÊNCIA DE MUDAS MORTAS DE ARAUCÁRIA MORTAS APÓS INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DOS QUATRO GRUPOS DE HOSPEDEIROS

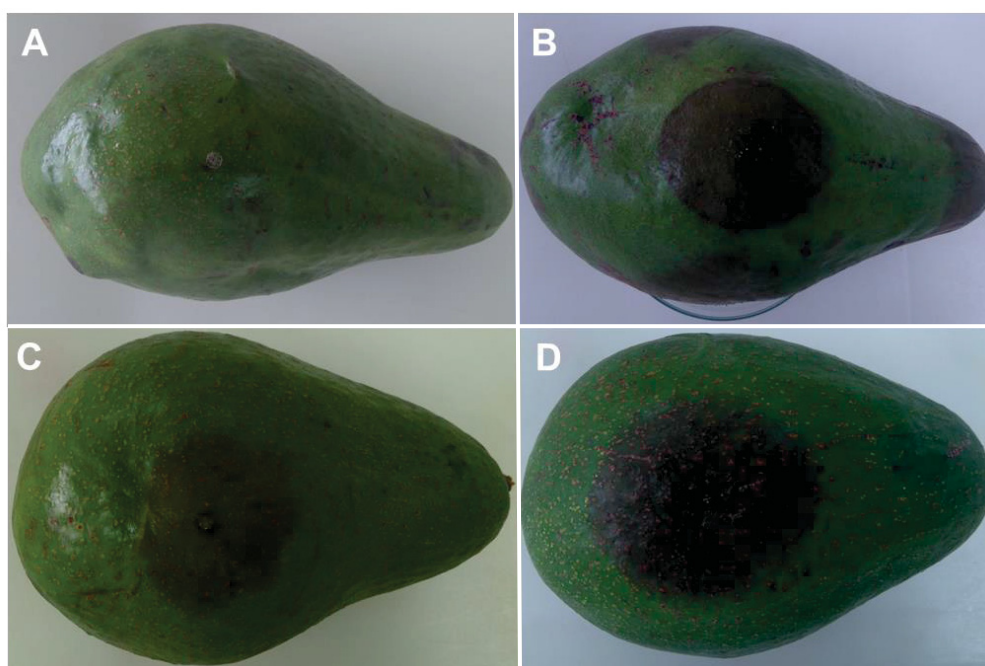
(conclusão)

Plátano													
PLATANO A	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20 e
PLATANO B	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	40 d
AMOSTRA 1B	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	40 d
AMOSTRA 2A	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	40 d
AMOSTRA 2C	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	20 e
Rizosfera													
1137	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	40 d
1149	1	1	2	2	4	4	4	4	4	4	5	5	100 a
1150	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	3	4	80 b
1172	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	60 c
1174	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	60 c
1175	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	40 d
1186	0	0	0	0	1	2	3	1	3	3	3	3	60 c
1335	0	2	2	2	2	2	2	4	4	4	4	4	80 b
1336	0	0	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	40 d
1407	0	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	60 c
1408	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	60 c
2383	0	1	2	3	3	3	5	5	5	5	5	5	100 a
2386	0	2	2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	100 a
2412	0	1	2	2	4	4	5	5	5	5	5	5	100 a

NOTA: Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

No teste de patogenicidade realizado em frutos de abacate, todos os isolados causaram lesões típicas nos frutos (FIGURA 15), caracterizadas pelo escurecimento ao redor do inóculo.

FIGURA 15 - TESTE DE PATOGENICIDADE EM FRUTOS DE ABACATE SETE DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE *Phytophthora cinnamomi*. A – TESTEMUNHA, B – AR – 24, C – PLATANO A, D – 1175.



FONTE: O autor (2017).

Os isolados foram agrupados pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) de acordo com o tamanho da lesão (TABELAS 10 e 11). Verificou-se que o grupo de isolados de araucária apresentou maiores lesões quando comparado ao grupo de isolados de plátano, onde um isolado apresentou a menor média avaliada.

TABELA 10 - ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* AGRUPADOS EM RELAÇÃO AO TAMANHO DA LESÃO EM FRUTOS DE ABACATE SETE DIAS APÓS INOCULAÇÃO.

Isolados	Tamanho da lesão (cm)				
	2,9	4,75 – 5,38	5,69 – 7,25	7,5 – 9,13	9,2 – 11,25
Araucária	-	AR35	AR36 AR37	AR23	
				AR24	
				AR25	
				AR31	
				AR32	
				AR33	
				AR34	AR2
				AR40	AR20
				AR41	
				AR42	AR21
				AR42A	AR22
				AR43	
				AR43A	AR26
				AR44	
				AR44A	AR30
				AR45A	
				AR46	
				AR46A	
				AR47	
				AR50	
				AR51	
				AR52	
Abacate	-	AB1	AB2 AB5 AB6 AB14	AB3	
				AB9	AB21B
				AB15	AB21C
				AB19	AB22
				AB20	AB22A
				AB21	
				AB21A	
Plátano	Amostra2A	PlatanoA	PlatanoB	Amostra1B	-
Rizosfera	-	-	1137	Amostra2C	
			1149	1150	1172
			1174	1335	1407
			1175	2383	1408
			1186	2386	1336
				2412	



TABELA 11 - ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DOS QUATRO GRUPOS DE HOSPEDEIROS AGRUPADOS POR TESTE DE SCOTT-KNOTT EM RELAÇÃO AO TAMANHO DA LESÃO EM FRUTOS DE ABACATE 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO

(continua)

Isolado	R1	R2	R3	R4	MÉDIA
AR2	9,75	9,5	10,5	8	9,4 a
AR20	8,5	9,5	9	10,3	9,3 a
AR21	9,3	10,5	10	9,7	9,9 a
AR22	9,7	9,7	11	9	9,9 a
AR23	10	8	8	8,1	8,5 b
AR24	5,5	12	12,3	6,5	9,1 b
AR25	10,9	7	6,5	11	8,9 b
AR26	9	9,8	10	9	9,5 a
AR27	7,75	7,75	8,5	6,75	7,7 b
AR30	9,3	9	9	9,5	9,2 a
AR31	7,5	8,5	7	10,3	8,3 b
AR32	6,75	9,7	9,5	10	9,0 b
AR33	7,75	7	11	9,5	8,8 b
AR34	8,5	10	8	8	8,6 b
AR35	4,5	4,5	7	5,5	5,4 d
AR36	7,5	6	7	8,5	7,3 c
AR37	6,5	6,5	5	5	5,8 c
AR38	9	8	9,5	7	8,4 b
AR40	7,75	7	6,5	9	7,6 b
AR40A	8	9	8,5	7,25	8,2 b
AR41	7,75	8,5	6,75	7,75	7,7 b
AR41A	7	7	8,5	8,5	7,8 b
AR42	8,75	8,25	8,75	8,75	8,6 b
AR42A	7,75	7,75	7	7,5	7,5 b
AR43	7,6	7,8	8,3	8	7,9 b
AR43A	7,75	8,3	7,7	8,8	8,1 b
AR44	8,5	9,5	9	8,75	8,9 b
AR44A	8,5	9	8,75	8,75	8,8 b
AR45	9,5	9,5	9,75	9,5	9,6 a
AR45A	8	8,75	8,5	9,75	8,8 b
AR46	8	9,5	8,75	9	8,8 b
AR46A	8,5	7,75	9	8,5	8,4 b
AR47	8,25	9	9	9	8,8 b
AR47A	9,5	9,5	9,75	9,75	9,6 a
AR49	8,5	8,75	8,25	8	8,4 b
AR50	7,5	8,5	9,25	8,5	8,4 b
AR51	8	9	9,75	8,5	8,8 b
AR52	9,75	9,75	9	8	9,1 b
AB1	4,25	6,25	3,25	5,25	4,8 d
AB2	7,25	7,3	6,8	6,8	7,0 c

TABELA 11 - ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DOS QUATRO GRUPOS DE HOSPEDEIROS AGRUPADOS POR TESTE DE SCOTT-KNOTT EM RELAÇÃO AO TAMANHO DA LESÃO EM FRUTOS DE ABACATE 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO

(conclusão)

Isolado	R1	R2	R3	R4	MÉDIA
AB3	8,7	8,25	8,25	7,9	8,3 b
AB5	9,5	6,5	5,5	5,5	6,8 c
AB6	8,5	5,1	3,75	7,5	6,2 c
AB9	8	8,5	5	8,5	7,5 b
AB11	6,1	6	6	4,75	5,7 c
AB14	4,5	4,5	4,5	5,5	4,8 d
AB15	9,5	10,3	7,5	8,25	8,9 b
AB19	8	8,25	8	8	8,1 b
AB20	8,5	9	9,5	8,5	8,9 b
AB21	7,1	8,5	10,25	9,75	8,9 b
AB21A	9	6,5	10,25	9,75	8,9 b
AB21B	10,9	9,3	9,25	10	9,9 a
AB21C	10	10,25	10,25	10,6	10,3 a
AB22	10	9	9	9	9,3 a
AB22A	9	9,25	9,5	9	9,2 a
PLATANO A	4,5	3	6,5	5,75	4,9 d
PLATANO B	7,5	7	7,25	7	7,2 c
AMOSTRA 1B	7,5	8,75	8,75	8	8,3 b
AMOSTRA 2A	2,3	4	3	2,3	2,9 e
AMOSTRA 2C	8,75	8,75	9,75	8,25	8,9 b
1137	6,25	7,25	5,75	8	6,8 c
1149	7,5	7,25	7	6	6,9 c
1150	8,25	9	9,25	9	8,9 b
1172	9,25	9,5	9,5	9,5	9,4 a
1174	6,25	6,5	6	6	6,2 c
1175	6,5	6,25	5	6	5,9 c
1186	5,5	7	5	5,25	5,7 c
1335	9	9,25	9	9,25	9,1 b
1336	10,5	10	10	10,5	10,3 a
1407	10,5	9	10	10	9,9 a
1408	11	11,5	11,5	11	11,3 a
2383	9	8,5	8	9,5	8,8 b
2386	10	8	8,5	9	8,9 b
2412	8	9,75	8,5	9	8,8 b

NOTA: Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

### 3.4 DISCUSSÃO

Este trabalho analisou 74 isolados de *P. cinnamomi* provenientes de araucária (Grupo 1), abacateiro (Grupo 2), plátano (Grupo 3) e rizosfera (Grupo 4) e de quatro regiões brasileiras Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Bahia quanto às suas características morfofisiológicas, patogênica e sequências das regiões de ITS e COX1 e COX2. Não se verificou diversidade entre os isolados de *P. cinnamomi* em função do hospedeiro e do local de origem do isolado com base nas características avaliadas. No entanto, foram verificadas variações intraespecíficas quanto à morfologia, patogenicidade e características moleculares dos isolados analisados.

No grupo 1 - araucária o padrão rosáceo foi o mais encontrado seguido de cotonoso. O mesmo se verificou para o grupo 2 – abacate, ocorrendo igualmente no grupo de abacateiro. No grupo 3 - plátano houve a ocorrência apenas do padrão cotonoso, assim como para o grupo 4 - rizosfera. O padrão rosáceo é o predominante relatado por vários autores para *P. cinnamomi* (EGGERS; BALCI; MACDONALD, 2012). Zentmyer (1980) encontrou este padrão como o mais comum em sua coleção de 334 isolados de diferentes países, principalmente para o tipo de compatibilidade A2, assim como os isolados deste estudo. Waterhouse (1963) descreve este padrão para *P. cinnamomi*.

As temperaturas limites de crescimento micelial para os quatro grupos de isolados foram 12 e 32 °C, não se verificando crescimento a 8 e 36 °C. A temperatura ótima de crescimento não diferiu para os quatro grupos, sendo em média 22 °C. Mesmo não havendo diferenças significativas nas medidas limites nem na temperatura ótima entre os grupos de isolados, houveram isolados que tiveram crescimento relativamente maior que os outros em todas as faixas de temperatura. Os isolados AR41 e AR47 de araucária, os isolados AB21 e AB21A de abacate, e os isolados PlatanoA e PlatanoB de plátano apresentaram crescimento relativamente maior em todas as temperaturas avaliadas. Os isolados em estudo apresentaram temperaturas mínimas de crescimento maiores do que as relatadas em outros trabalhos bem como temperaturas ótimas menores, respectivamente (WATERHOUSE, 1964; ZENTMEYER, 1987; HÜBERLI et al., 2001).

Shepherd e Pratt (1974) relataram que uma grande variação no crescimento das colônias ocorre entre isolados de diferentes hospedeiros e regiões, mas não em uma população de uma mesma região. Um estudo de 364 isolados australianos de

*P. cinnamomi* conduzido por estes autores demonstrou que diferenças consideráveis de crescimento existem entre populações de diferentes regiões. Zentmyer et al. (1976) relataram que a variabilidade pode estar associada com o hospedeiro ou a origem geográfica.

Caracteres morfológicos ainda são a base primordial para a identificação de espécies de *Phytophthora* (HO; ZENTMYER, 1977; WATERHOUSE; NEWHOOK; STAMPS, 1983) e a identificação de *P. cinnamomi* em comparação a outras espécies de *Phytophthora* é relativamente simples (ZENTMYER, 1980). A avaliação dos caracteres morfológicos engloba as características das hifas, as estruturas assexuadas, esporângios e clamidósporos, e as estruturas sexuadas, os gametângios (oogônios e anterídios). Nas observações realizadas, verificou-se hifa cenocítica e a presença em todos os isolados de estruturas esféricas denominadas dilatações, característica considerada marcadora de *P. cinnamomi* (WATERHOUSE, 1963; GALLEGLY; HONG, 2008).

Os esporângios apresentaram-se persistentes e não papilados em todos os isolados, elipsoides e obovoides em sua maioria nos grupos 1- araucária e 2- abacate, elipsoides e globosos em isolados do grupo 3- plátano e elipsoides em isolados do grupo 4- rizosfera. Apesar de não apresentar diferença estatística, os isolados do grupo 3- plátano tiveram valores médios de comprimento x largura destas estruturas relativamente menores (32,74 x 25,02  $\mu\text{m}$ ) quando comparados aos isolados de araucária (41,1 x 27,5  $\mu\text{m}$ ). Estas estruturas, em todos os grupos de isolados, foram relativamente menores do que as médias verificadas nas descrições de Waterhouse (1963), Frezzi (1950) e Gallegly (2008). Os grupos de araucária e abacate tiveram isolados com valores máximos marcadamente maiores de comprimento de esporângio, sendo os isolados AR20 (71,25  $\mu\text{m}$ ), AR23 (75  $\mu\text{m}$ ), AR24 (83,75  $\mu\text{m}$ ) e AR47A (65  $\mu\text{m}$ ) de araucária e os isolados AB1 (70  $\mu\text{m}$ ), AB19 (67,5  $\mu\text{m}$ ), AB21A (76,5  $\mu\text{m}$ ) e AB22A (72,1  $\mu\text{m}$ ) de abacateiro. A relação comprimento/largura foi relativamente menor no grupo de rizosfera (1,3). Os clamidósporos, não foram observados nos isolados AR25 de araucária e AB9 de abacate, estando presente em todos os demais isolados, não diferindo significativamente entre os grupos de isolados. A maior variação entre isolados neste estudo foi na dimensão dos esporângios e não nos gametângios e clamidósporos, como observado anteriormente (ZENTMYER, 1980).

Todos os isolados deste estudo foram classificados como heterotáticos e foi constatada a presença de apenas um tipo de compatibilidade A2. Os oósporos tiveram valores médios similares nos quatro grupos de isolados, bem como os oogônios. O anterídio apresentou-se anfígeno para os quatro grupos de isolados diferindo quanto à dimensão quando comparados aos trabalhos de Waterhouse (1963) e Gallegly (2008). Apenas o tipo de compatibilidade A2 esteve presente o que é consistente com estudos previamente publicados (GALINDO; ZENTMYER, 1964; HO, ZENTMYER, 1977; ZENTMYER, 1980; BENSON, GRAND, 2000).

Em relação à patogenicidade houve diferença estatística entre os grupos de isolados, tanto no teste instalado em mudas de araucária, quanto no teste instalado em frutos de abacate. No primeiro, um grande número de isolados do grupo de araucária produziu incidência total de mortalidade nas mudas (AR20, AR22, AR24, AR25, AR33, AR35) quando comparado ao grupo de abacate (AB5, AB9). Os isolados de rizosfera também apresentaram incidência total nesse teste (1149, 2383, 2386, 2412). Em contraste, os isolados de plátano tiveram valor máximo de 40% de incidência (PlatanoB, Amostra1B, Amostra1A), e tendo dois isolados apresentando 20% de incidência (PlatanoA e Amostra2C). No teste em frutos de abacate, novamente o grupo de araucária apresentou maior número de isolados ocasionando maiores lesões (9,2 – 11,5 cm), os isolados AR2, AR20, AR21, AR22, AR26 e AR30. Os isolados de abacate que ocasionaram maiores lesões foram AB21B, AB21C, AB22 e AB22A de igual número aos de rizosfera (1172, 1336, 1407, 1408). Em oposição a estes valores o isolado que apresentou menor lesão (2,9 cm) foi o isolado de plátano Amostra2A.

A análise molecular realizada em alguns isolados, representativos de cada população, revelou a similaridade com a espécie *P. cinnamomi*. Os caracteres morfofisiológicos juntamente ao sequenciamento das regiões ITS e COX dão suporte para a identificação dos isolados dos quatro grupos de hospedeiros como pertencentes a esta espécie. No entanto, houve a separação evidente de dois clados principais de isolados, nas análises realizadas para a região ITS. Um dos clados engloba isolados de índices de similaridade de 99 a 100% com as sequências da espécie *P. cinnamomi* var. *cinnamomi*, e o outro clado, isolados de similaridades de índices que foram equivalentes tanto para *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* quanto para *P. cinnamomi* var. *parvispora*.

Os dados revelam dessa forma que os isolados identificados neste estudo formaram um grupo morfofisiológico e patogênico diversificado, apesar de pertencerem à mesma espécie, e algumas dessas diferenças são confirmadas pela análise filogenética. A variação dentro do grupo de isolados foi maior do que a variação dentre grupos de isolados. Os isolados de araucária AR2, AR20 e AR21 que tiveram esporângios relativamente maiores, incidência maior e maior tamanho de lesão nos testes de agressividade, permaneceram agrupados no mesmo clado na análise filogenética baseada na região ITS. Existe evidência de que os isolados AR24, AR49 e AR51 sejam diferentes do restante dos isolados de araucária, pois foram separados pelas diferenças nas suas sequências dos outros isolados. Para o grupo de abacateiro, os isolados AB11, AB19 e AB21A, tiveram as mesmas características morfológicas e patogênicas, e também permaneceram no mesmo agrupamento de isolados formado na árvore. Isolados de plátano e da rizosfera da Mata Atlântica da Bahia permaneceram no mesmo clado na árvore construída com isolados dos quatro grupos, indicando maior similaridade entre isolados destes dois grupos de hospedeiros.

A árvore formada com base nas sequências da região COX de alguns isolados caracterizados, três isolados agruparam em um clado distinto (AB21A, 2386 e 1149). A análise sugere também que os isolados de abacateiro AB1 e AB9 sejam diferentes, pois foram agrupados em um segundo clado distinto. Não houve relação entre morfologia e agressividade dos isolados com os agrupamentos obtidos por meio da análise filogenética.

As informações obtidas de cada grupo de isolados revelam que existe variabilidade morfofisiológica, patogênica e molecular nos isolados de cada grupo e variação também entre os grupos de isolados. A caracterização molecular indica que todos os isolados apresentam similaridade e são identificados como *P. cinnamomi*, de forma que as diferenças encontradas nos caracteres avaliados representam certa variabilidade nas populações onde a espécie está ocorrendo ou um alto grau de plasticidade fenotípica, uma vez que a presença de apenas um tipo de compatibilidade foi verificado. Tais informações corroboram com estudos prévios realizados por diferentes autores (PRATT; HEATHER; SHEPHERD, 1972; SHEPHERD; PRATT; TAYLOR, 1974; ZENTMYER, 1983), que também relataram que o tipo de compatibilidade A1 de isolados, é pouco frequente.

A ocorrência dessa variabilidade nas características fenotípicas e genotípicas aumenta o potencial de sobrevivência do patógeno às condições adversas ou para resistir às medidas de controle. Onde o nível de variabilidade do patógeno é alto, há o potencial para sua evolução e adaptação ao ambiente e a pressão de seleção criada pela situação onde este é forçado a modificar-se para sobreviver. Para se desenvolver estratégias de manejo de sucesso para uma doença, é importante e essencial se determinar a extensão dessa variação fenotípica e genotípica entre a população do agente causal.

São de extrema importância o estudo de caracterização e diversidade de *P. cinnamomi*, dada sua relevância e importância no cenário mundial, sendo este um dos patógenos mais destrutivos e tendo uma alta e diversa gama de hospedeiros. No Brasil, este é o primeiro estudo que caracteriza e identifica diversidade entre isolados de populações de diferentes regiões brasileiras, sendo pioneiro no cenário nacional e na América do Sul a tratar desta espécie. É importante destacar que novos relatos desta espécie como fitopatógeno no Brasil, estão sendo cada vez mais comuns, sendo assim, estudos como estes são de grande auxílio no futuro como base para consulta e comparação.

### 3.5 CONCLUSÕES

Os isolados de *P. cinnamomi* provenientes de araucária, abacateiro, plátano e rizosfera de plantas da Mata Atlântica de diferentes regiões brasileiras apresentaram baixa variabilidade;

Não se verificou variação intraespecífica nas características morfofisiológicas dos grupos de isolados de *P. cinnamomi*;

Pela análise filogenética da região ITS verificou-se que existe variabilidade entre isolados do mesmo grupo de hospedeiro, mas não entre isolados oriundos de hospedeiros diferentes. Existe evidência filogenética de que os isolados de *P. cinnamomi* AR24, AR49 e AR51 de araucária sejam genotipicamente distintos dos outros isolados deste hospedeiro. Da mesma forma, os isolados de *P. cinnamomi* AB22 e AB22A são distintos dos outros isolados de abacateiro;

A análise dos genes COX1 e COX2 possibilita afirmar que os isolados AB21A, 2386 e 1149 formam um grupo distinto, bem como os isolados AB1 e AB9.

Os isolados de *P. cinnamomi* de araucária foram os mais agressivos.



### 3.6 REFERÊNCIAS

- BENSON, D. M.; GRAND, L. F. Incidence of *Phytophthora* root rot of Fraser Fir in North Carolina and sensitivity of isolates of *Phytophthora cinnamomi* to metalaxyl. **Plant Disease**, v. 84, p.661-664. 2000.
- DELL, B.; MALAJCZUK, N. Jarrah dieback - A disease caused by *Phytophthora cinnamomi*. P. 67-87 in: **The Jarrah Forest: A Complex Mediterranean Ecosystem**. B. Dell, J.J. Havel, and N. Malajczuk, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 1989.
- DUDZINSKI, M. J.; OLD, K.M.; GIBBS, R.J. Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. **Australian Journal of Botany**, v. 41, p. 721-732. 1993.
- EGGERS, J. E.; BALCI, Y.; MACDONALD, W. L. Variation among *Phytophthora cinnamomi* isolates from oak forest soils in the eastern United States. **Plant Disease**, v. 96, p.1608-1614. 2012.
- ÉRSEK, T.; RIBEIRO, O. Mini review article: an annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 45, p. 251-266. 2010.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, vol.38, n.2, p. 109-112.
- FREZZI; MARIANO, J. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, v.4, p. 47-133.1950.
- GALINDO, J; ZENTMYER, G. A. Mating types in *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 54, p.9. 1964.
- GALLEGLY, M.E.; HONG, C. **Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints**. St. Paul, Minnesota. 2008.
- HARDHAM, A. R. *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant Pathology**, v.6, p. 589-604. 2005.
- HARDY, G.; SIVASITHAMPARAM, K. *Phytophthora* spp. associated with container grown plants in nurseries in Western Australia. **Plant Disease**, v. 72, p. 435-437. 1988.
- HO, H. H.; ZENTMYER, G. A. Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. **Mycologia**, v. 69, p. 701 - 713. 1977.
- HÜBERLI, D.; HARDY, G.E.; TOMMERUP, I.C. **Morphological and physiological characteristics of two *Phytophthora cinnamomi* populations**. In: Eleventh Biennial Conference of the Australian Plant Pathology Society: 307. Perth, WA. 1997.

HÜBERLI, D.; TOMMERUP, I.C.; DOBROWOLSKI, M.P.; CALVER, C.; HARDY, G.E. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. **Mycological Research**, v. 105, n. 9, p. 1053-1064. 2001.

JONES, R. K.; BENSON, D. M. **Diseases of Woody Ornamentals and Trees in Nurseries**. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 2001.

KROON, L.P.N.M.; BROUWER H.; COCK, A.; GOVERS, F. The Genus *Phytophthora*. **Phytopathology**, v.102, p. 348-364. 2012.

MAGALHÃES, D.M.A. **Diversidade de fungos na serapilheira e de *Phytophthora* na rizosfera de plantas da Mata Atlântica no Sul da Bahia**. Dissertação. 139 f. (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéu. 2009.

MARTIN, F. N.; COFFEY, M. D. Mitochondrial haplotype analysis for differentiation of isolates of *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 102, p.229-239. 2012.

NOWICKI, M.; FOOLAD, M. R.; NOWAKOWSKA, M.; KOZIK, E. U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. **Plant Disease**, v. 96, p. 4-17. 2012.

PRATT, B. H.; HEATHER, W. A.; SHEPHERD, C. J. Transcontinental occurrence of A1 and A2 strains of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 1099 -1100. 1972.

SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; ALVES, T. C. A.; VIDA, J. B.; HARAKAVA, R. Root and Crown Rot of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Journal of Phytopathology**, v. 159 p.194–196. 2011.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; REIS, A. *Phytophthora* spp.: **Distribuição e Associação com Espécies Florestais**. In: Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 47.; simpósio brasileiro de mofo branco, 2014, Londrina. Desafios futuros: anais. Londrina: SBF, 2014.

SHEARER, B.; CRANE, C.; COCHRANE, A. Quantification of the susceptibility of the native flora of the South-West Botanical Province, Western Australia, to *Phytophthora cinnamomi*. **Australian Journal of Botany**, v. 52, p. 435-443. 2004.

SHEPHERD, C. J.; PRATT, B. H. Temperature-growth relations and genetic diversity of A2 mating-type isolates of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. **Australian Journal of Botany**, v. 22, p. 231 - 249. 1974.

SHEPHERD, C. J.; PRATT, B. H.; TAYLOR, P. A. Comparative morphology and behavior of A1 and A2 isolates of *Phytophthora cinnamomi*. **Australian Journal of Botany**, v. 22 , p. 461 - 470. 1974.

WATERHOUSE, G. M.; NEWHOOK, F. J.; STAMPS, D. J. Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology*,

**and Pathology** (eds. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao) American Phytopathological Society, Minnesota, USA, p. 139 - 147. 1983.

WATERHOUSE, G.M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K. **Mycological Papers**, n.92. 1963.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: **PCR protocols: a guide to methods and applications**, (M. A. Inis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds.), San Diego. 1990.

ZENTMYER, G. A.; LEARY, J. V.; KLURE, L. J.; GRANTHAM, G. L. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. **Phytopathology**, v. 66, p. 982 - 986. 1976

ZENTMYER, G.A. *Phytophthora cinnamomi* and the Diseases it Causes. Monograph No. 10. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 1980.

## 4 CAPÍTULO II - MORTE DE ÁRVORES DE PLÁTANO CAUSADA POR

*Phytophthora cinnamomi*

### Resumo

Em 2016, quatro isolados do oomiceto *Phytophthora* foram obtidos de isolamentos provenientes de amostras de árvores de plátano (*Platanus acerifolia*) na região de Curitiba, estado do Paraná (Brasil). As plantas apresentavam podridão das raízes e colo. O objetivo deste estudo foi caracterizar os isolados a partir de análises morfológica e molecular visando sua identificação específica. Avaliou-se o crescimento micelial dos isolados em oito temperaturas, formação e dimensões de estruturas sexuadas e assexuadas e foi realizada a análise molecular com base na região ITS do DNA. Foi realizado, também, teste de patogenicidade em mudas de araucária, plátano e frutos de abacate. Os isolados apresentaram crescimento ótimo na faixa de 20 a 28 °C e não foi verificado crescimento micelial em 8 e 36 °C. As colônias dos isolados apresentaram-se cotonosas com micélio pouco denso. Os isolados formaram esporângios persistentes, predominantemente elipsoides, sem papilas, com média de 32,5 x 24,2 µm. Observou-se a formação de clamidósporos globosos e terminais com diâmetro médio de 38,4 µm. Todos os isolados apresentaram-se heterotáticos, do tipo de compatibilidade A2, com oósporos de anterídio anfígeno com diâmetro médio de 30 µm. A análise molecular realizada demonstrou 99% de similaridade do isolado de plátano com as sequências disponíveis no GenBank e Phytophthora-ID para *Phytophthora cinnamomi*. Com base nestes caracteres os isolados foram identificados como *Phytophthora cinnamomi* Rands. Este é o primeiro relato desta espécie causando morte de árvores de plátano no Brasil.

**Palavras-chave:** Taxonomia, Oomiceto, Doença, *Platanus*, ITS

## ETIOLOGY OF THE DEATH OF PLANE TREES ASSOCIATED WITH *Phytophthora cinnamomi*

### Abstract

In 2016, four isolates of the oomycete *Phytophthora* were obtained from isolates from plane trees (*Platanus acerifolia*) in the region of Curitiba, Paraná state (Brazil). The plants had rot of the roots. The objective of this study was to characterize the isolates from morphological and molecular analyzes aiming at their specific identification. The mycelial growth of the isolates at eight temperatures, formation and dimensions of sexed and asexual structures was evaluated and the molecular analysis based on the ITS region of the DNA was performed. A pathogenicity test was also carried out on araucaria, plane seedlings and avocado fruits. The isolates presented optimum growth in the range of 20 to 28 ° C and no mycelial growth was observed at 8 and 36 ° C. The colonies of the isolates were classified as cotton-like with a low dense mycelium. The isolates formed persistent sporangia, predominantly ellipsoid, without papillae, with a mean of 32.5 x 24.2 µm. Formation of globular and terminal chlamydospores with a mean diameter of 38.4 µm was observed. All the isolates were heterothallic and from the A2 type of compatibility, presenting oospores with aphygenous antheridia, measuring on average 30 µm. The molecular analysis performed demonstrated 99 % similarity of the isolate to the available GenBank and Phytophthora-ID sequences for *Phytophthora cinnamomi*. Based on these characters the isolates were identified as *Phytophthora cinnamomi* Rands. This is the first report of this species causing death of plane trees in Brazil.

**Key-words:** Taxonomy, Oomycete, Disease, *Platanus*, ITS

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O plátano, *Platanus acerifolia* (Aiton) Willd., é originário do hemisfério norte e pertence à família Platanaceae que possui apenas um gênero, *Platanus*. Esta é uma espécie florestal bastante utilizada mundialmente, principalmente como árvore ornamental na arborização de ruas, parques e praças e também pela qualidade de sua madeira empregada na carpintaria, fabricação de móveis, pisos e sendo utilizada também como quebra-vento (18). É uma espécie resistente à poluição urbana e se adapta bem a solos compactados. O uso extensivo do gênero se dá principalmente na Europa, embora seja encontrado na América do Norte, México e Índia (20). No Brasil, a espécie mais utilizada é o *Platanus acerifolia* e tem sido utilizada preferencialmente para arborização urbana e plantios ornamentais e seu cultivo ocorre principalmente na Região Sul, devido ao clima frio.

No Brasil existem relatos de *P. cinnamomi* em vários cultivos agrícolas como cebola, abacaxi, maracujá, citros, abacate e em algumas espécies florestais como a araucária (22). Recentemente, tem sido observada a morte de árvores de plátano em vários locais na região metropolitana de Curitiba - Paraná, Brasil. Nos isolamentos realizados em amostras provenientes dessas árvores, constatou-se a presença do oomiceto *Phytophthora*.

O gênero *Phytophthora* é amplamente conhecido por sua grande importância histórica, principalmente em relação à *Phytophthora infestans*, espécie que devastou os batatais irlandeses, principal fonte de alimento da população irlandesa nos séculos XVII, XVIII a XIX (9). Este gênero está distribuído em todas as áreas geográficas do mundo e são comuns relatos de novos hospedeiros para as espécies existentes, e dentre as plantas catalogadas como hospedeiras de uma ou mais espécies de *Phytophthora* estão às espécies florestais (22). O gênero *Phytophthora* compreende aproximadamente 100 espécies, sendo sua maioria fitopatogênica (15), com cerca de 24 espécies ocorrendo no Brasil (21). Dentre as espécies do gênero, *Phytophthora cinnamomi* Rands se destaca por ser considerado como um dos patógenos mais devastadores, sendo capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros, dentre estas espécies cultivadas e florestas (29, 4). Esta espécie tem destaque também devido ao grande impacto econômico e ambiental, bem como o declínio da floresta de eucaliptos e de mais de 90 espécies de plantas no Oeste da Austrália (17). O patógeno já foi descrito também causando doença e morte de

árvores de plátano na Argentina (10), Estados Unidos (7), Austrália (13) e, mais recentemente, na Itália (19).

O presente estudo teve por objetivo identificar o agente causal da morte de árvores de plátano por meio de análise morfofisiológica, patogênica e molecular. Trata-se de uma contribuição a já extensa lista de hospedeiros deste patógeno no Brasil e também de grande auxílio ao estudo da distribuição desta espécie mundialmente.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Isolamento

Para isolamento do patógeno foram usadas amostras de solo e raízes das árvores sintomáticas no município de Curitiba-PR. Duas amostras foram coletadas a cerca de 20 cm de distância do tronco e 20 cm de profundidade do solo. As amostras, com cerca de 1 Kg, foram levadas ao Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas (Colombo, PR). O solo foi homogeneizado e uma subamostra foi colocada em um recipiente plástico devidamente desinfestado com álcool 70 % e, logo após, foram colocados como iscas frutos de abacate. Posteriormente, o recipiente foi preenchido até a metade da capacidade com água ultrapurificada e cobriu-se os recipientes com plástico filme e deixado sob luz fluorescente contínua no ambiente de laboratório. Quatro dias após a observação da formação de uma linha enegrecida no fruto de abacate, procedeu-se o isolamento a partir da coleta de fragmentos da região de transição entre tecido sadio e doente, retirando-se previamente a casca. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri (90 mm de diâmetro) com meio de ágar 2% suplementado com antibióticos (ampicilina 80 ppm e cloranfenicol 40 ppm). As placas foram colocadas em câmara BOD a 24 °C, por quatro dias, no escuro. Após esse período, os isolados foram obtidos e repicados para placas de Petri contendo meio V8-ágar (200 mL de suco V8, 3 g de  $\text{CaCO}_3$ , 18 g de ágar e 800 mL de água ultrapurificada). Os isolados foram incorporados à coleção do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, mantidos em tubos de ensaio contendo meio V8-ágar e em frascos com água, pelo método de Castellani.



#### 4.2.2 Teste de Patogenicidade

O teste de patogenicidade foi conduzido em mudas de plátano e, também, em mudas de araucária e em frutos de abacate, no período de dezembro de 2016. Foram utilizadas mudas de plátano e de araucária com aproximadamente seis meses de idade, sendo cinco mudas por isolado e quatro frutos de abacate sem sintoma por isolado, em delineamento inteiramente casualizado. Foram adotados os tratamentos culturais de viveiros da Embrapa Florestas, sendo as mudas cultivadas em vermiculita expandida dentro de tubetes. O teste de patogenicidade foi conduzido em diferentes hospedeiros para comparação de sintomas e sinais, uma vez que araucária e abacate também são hospedeiros de *P. cinnamomi*. Para o teste, os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio V8-água por cinco dias. Nas mudas de plátano foi realizado um corte de 5 mm na região do colo onde foi depositado um disco de 5 mm de diâmetro de meio contendo micélio do isolado e, em seguida, coberto com fita. Nas mudas de araucária, na região do colo, foi retirada uma acícula e colocado um disco de 5 mm de meio contendo crescimento micelial. Na testemunha, para mudas de plátano e araucária, foi colocado um disco contendo apenas meio de cultura.

As avaliações foram realizadas semanalmente durante um mês. No teste com frutos de abacate, os frutos foram lavados e desinfestados com álcool 70% e lavados com água ultrapurificada esterilizada e, posteriormente, foram feitos ferimentos que consistiam de cinco furos com um estilete de ponta fina na casca dos frutos. Discos de 5 mm de diâmetro de meio contendo crescimento micelial foram colocados sobre os ferimentos, cobrindo-os posteriormente com algodão umedecido com água ultrapurificada. Os discos foram cobertos por fita adesiva e os frutos foram acondicionados em caixas plásticas tampadas contendo papel filtro umedecido com água ultrapurificada. O material foi incubado no ambiente de laboratório sob luz contínua por sete dias. Na testemunha colocou-se disco de cinco mm de diâmetro de meio de cultura sem patógeno. A avaliação consistiu na determinação do tamanho da lesão e observação de sintomas e sinais.

#### 4.2.3 Crescimento micelial e aspecto das colônias

Foram realizados ensaios de curva de crescimento micelial nas temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36 °C. As placas para o experimento foram dispostas

em delineamento inteiramente casualizado em câmara BOD, com três repetições por isolado. Os isolados foram crescidos em meio V8-água por cinco dias e, posteriormente, foram repicados discos de meio com micélio de cinco mm de diâmetro para placas contendo o mesmo meio. As placas foram incubadas nas oito temperaturas, em ausência de luz, com três repetições por isolado e o crescimento foi mensurado ao terceiro, quinto e sétimo dia após a instalação. As medições foram realizadas nos sentidos diametralmente opostos do crescimento radial da colônia, utilizando-se um paquímetro digital (Starrett®, série 799). O diâmetro da colônia foi expresso pela média aritmética das duas medidas, e foi calculada a média das três repetições. Para avaliação do aspecto morfológico das colônias, os isolados foram crescidos em câmara BOD a 24 °C, por sete dias, no escuro. Após este período foi avaliado o aspecto da colônia levando em consideração os padrões estabelecidos por Erwin e Ribeiro (9) como rosáceo, cotonoso e estrelado. Foram utilizados isolados de *P. cinnamomi* de araucária provenientes de Colombo-PR, previamente caracterizados para comparação de crescimento micelial com os isolados obtidos neste estudo.

#### 4.2.4 Características morfológicas das estruturas sexuadas e assexuadas

Foram avaliadas as estruturas assexuadas, esporângios e clamidósporos, e sexuadas, gametângios e oósporos, dos quatro isolados. Para a produção de esporângios, os isolados foram mantidos em meio V8-água por sete dias e, posteriormente, foram transferidos oito discos de cinco mm de diâmetro contendo micélio de cada isolado para placas de Petri contendo extrato de solo filtrado (40 g de solo e 1000 mL de água ultrapurificada esterilizada), não esterilizado segundo metodologia proposta por Erwin e Ribeiro (9). As placas foram acondicionadas a 24 °C sob luz contínua e avaliadas 72 h após a instalação. Foram preparadas lâminas para observação e medição de esporângios e clamidósporos.

Para a produção de oósporos, os isolados foram pareados com dois isolados padrões de *Phytophthora frígida*, dos tipos de compatibilidade A1 e A2. Os isolados padrões e os isolados em estudo foram cultivados em placas de Petri contendo meio V8-água por sete dias. Após este período foram pareados com os dois padrões em placas de Petri colocando-se de um lado da placa o isolado padrão e do lado oposto o isolado em estudo. As placas foram envoltas com papel alumínio e incubadas a 24

°C, em ausência de luz, por cinco dias. Posteriormente, procedeu-se o preparo de lâminas, raspando-se a superfície do meio de cultivo na região de contato entre os isolados e a compatibilidade dos isolados foi avaliada pela presença ou ausência de oósporos. Empregou-se o corante azul de metileno no preparo das lâminas.

As medições das estruturas foram realizadas em microscópio ZEISS® Axio Scope no aumento de 400x, sendo realizadas medições de 50 estruturas sexuadas e assexuadas para cada isolado. Foram utilizados isolados de *P. cinnamomi* de araucária e abacate previamente caracterizados para comparação de dimensão de estruturas com os isolados obtidos neste trabalho.

#### 4.2.5 Caracterização molecular

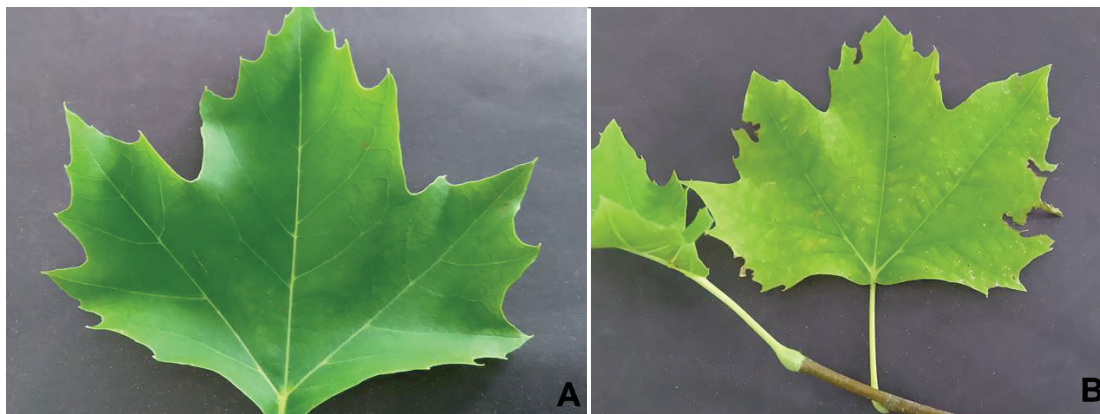
Para a identificação molecular dos isolados, o DNA foi extraído com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os isolados foram crescidos em placas contendo meio V8-ágar por cinco dias e posteriormente, dez discos de meio contendo micélio foram transferidos para meio líquido V8. Os frascos de Erlenmeyer foram colocados sob agitação contínua por 24 h, e então, o micélio formado foi retirado, lavado com água ultrapurificada e seco em papel filtro esterilizado. Foram pesadas 40 mg de micélio que foi macerado em nitrogênio líquido, colocado em microtubos e logo após, foi adicionada a solução de lise celular contida no kit de extração. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por uma hora e posteriormente seguiu-se o protocolo conforme recomendações do fabricante. Para a identificação dos isolados, foram amplificadas as regiões ITS1, ITS2 e gene 5.8S do DNA ribossômico empregando-se os pares de *primers* ITS6/ITS4 (28). A reação de PCR para a região ITS dos isolados foi realizada com um volume final de 15 µL sendo tampão de reação 1X, cloreto de magnésio à 1,5 mM, DNTP à 0,2 mM, primers à 0,4 mM e 0,75 U de Taq polimerase. Para a amplificação foram realizados 35 ciclos que consistiam de 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 1 min a 55 °C para anelamento e 1 min a 72 °C para extensão com 10 min de extensão final. Os produtos da PCR foram submetidos à análise em gel de agarose 1,5% para a visualização dos fragmentos amplificados de interesse. Após a PCR, os fragmentos foram purificados e procedeu-se o sequenciamento utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, conforme recomendações do fabricante. O sequenciamento foi

realizado em sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems), na UFPR. As sequências obtidas foram comparadas com acessos depositados no GenBank utilizando-se o “Nucleotide BLAST” no servidor do NCBI e com sequências depositadas no *Phytophthora*-ID, para identificação.

#### 4.3 RESULTADOS

Os dados dos resultados deste capítulo foram utilizados no capítulo I. Dos isolamentos realizados a partir do solo foram obtidos quatro isolados de *Phytophthora cinnamomi*. No teste de patogenicidade, em mudas de plátano, foram observados sintomas de murcha e amarelecimento após um mês da inoculação do patógeno (FIGURA 1), com posterior morte das plantas.

FIGURA 1 - TESTE DE PATOGENICIDADE COM ISOLADO DE *Phytophthora cinnamomi* EM MUDA DE PLÁTANO APÓS 30 DIAS. FOLHA SADIA (A) E FOLHA COM SINTOMA DE AMARELECIMENTO (B).



FONTE: O autor (2016).

Para as mudas de araucária, os isolados não foram patogênicos. Nos frutos de abacate inoculados com os isolados de *Phytophthora cinnamomi*, os sintomas eram visíveis aos quatro dias após a inoculação, caracterizando-se pelo escurecimento da região colonizada por *Phytophthora* sp. Neste período, as lesões tinham cerca de 41,8 mm de diâmetro (FIGURA 2). Na segunda avaliação, sete dias após a instalação, os frutos já estavam enegrecidos e totalmente colonizados pelo patógeno.

FIGURA 2 - TESTE DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* EM ABACATE QUATRO DIAS APÓS INOCULAÇÃO. FRUTOS INOCULADOS COM LESÃO EM A, B E C; TESTEMUNHA EM D.

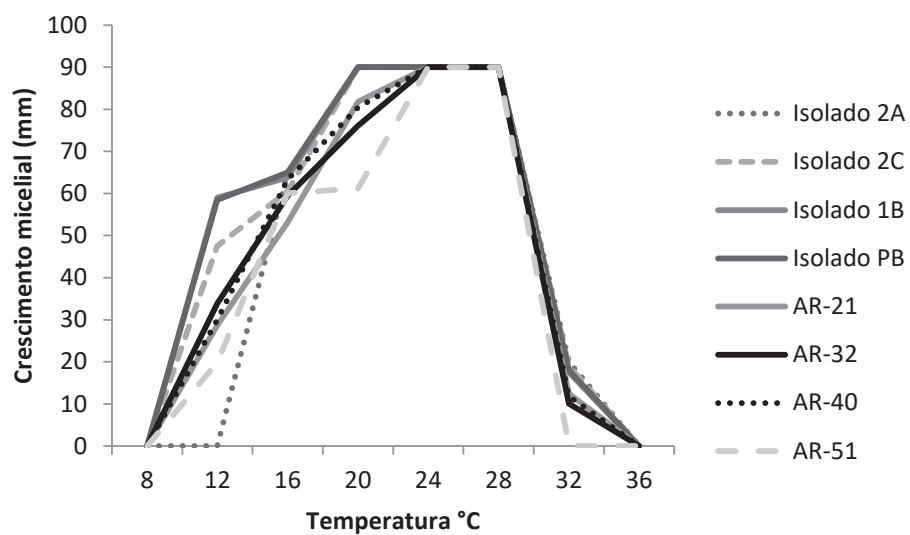


FONTE: O autor (2016).

O crescimento micelial e o aspecto morfológico das culturas foram similares para os quatro isolados. Não houve crescimento micelial para nenhum dos isolados a 8 e 36 °C e para um dos isolados a 12 °C. O maior diâmetro de crescimento micelial das colônias foi observado nas temperaturas de 20, 24 e 28 °C (FIGURA 3). Os quatro isolados apresentaram colônias com micélio aéreo, pouco denso e de aspecto cottonoso (FIGURA 4).

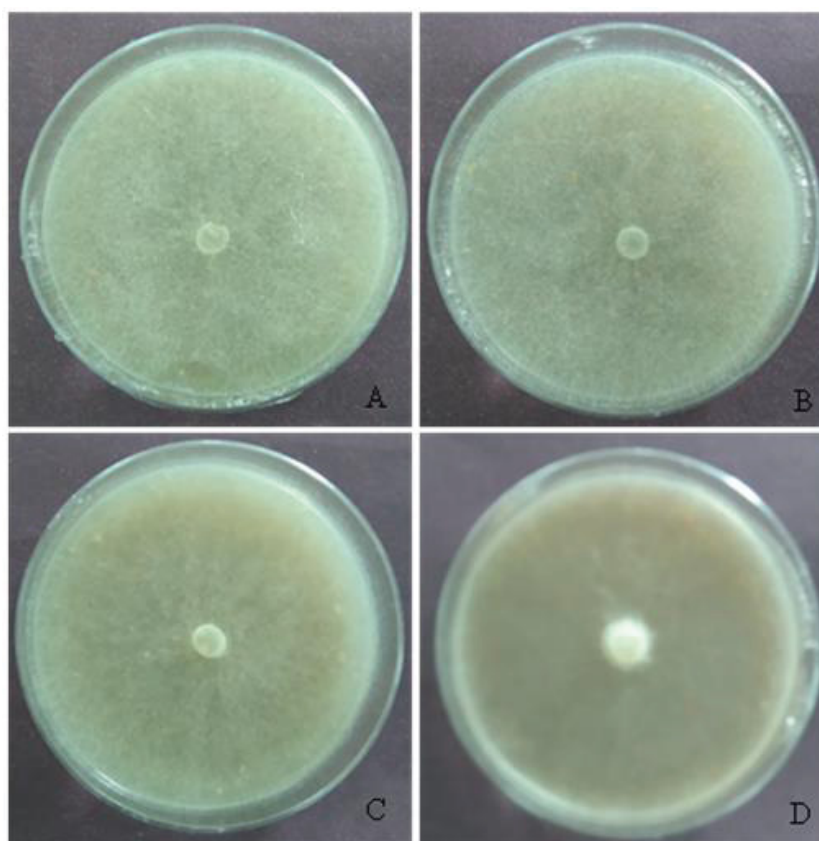


FIGURA 3 - CRESCIMENTO MICELIAL (MM) DE QUATRO ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PLÁTANO (ISOLADO 2A, ISOLADO 2C, ISOLADO 1B E ISOLADO PB) E DE *P. cinnamomi* DE ARAUCÁRIA (ISOLADOS AR-21, AR-32, AR-40 E AR-51).



Fonte: O autor (2017).

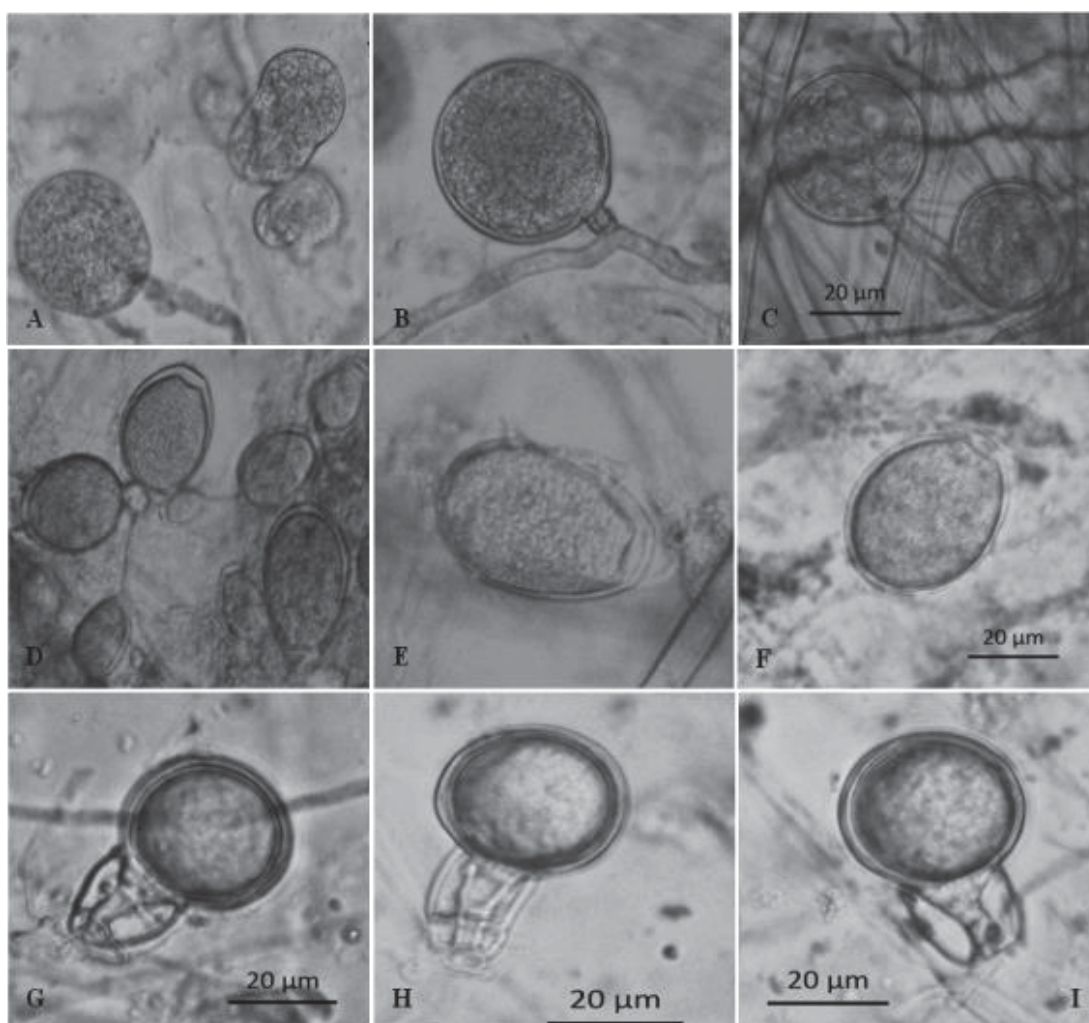
FIGURA 4 - ASPECTO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi*. DE PLÁTANO. A – ISOLADO 1B; B- ISOLADO 2C; C- ISOLADO 2A E D- ISOLADO PB.



FONTE: O autor (2017).

Os isolados obtidos apresentaram micélio hialino, com hifas cenocíticas do tipo coraloide, e presença de hifas com dilatações (FIGURA 4), que foram grandes e globosas, produzindo uma colônia compacta. Para melhor comparação e avaliação das estruturas sexuais e assexuais, foram utilizados isolados de *P. cinnamomi* já identificados, provenientes de isolamentos feitos de árvores de araucária. Todos os isolados avaliados apresentaram produção abundante de esporângios em extrato de solo não-autoclavado sob luz contínua, sendo estes persistentes, sem papilas, formados individualmente (FIGURA 5). Os esporângios apresentaram-se predominantemente elipsoides, embora outras formas também estivessem presentes tais como globoso e obovoide.

FIGURA 5 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* (AUMENTO DE 400X). A – DILATAÇÕES (ISOLADO 2A); B,C (ISOLADO PB, ISOLADO 1B) – CLAMIDÓSPOROS TERMINAIS; D,E,F (ISOLADO 2C, ISOLADO 2A, ISOLADO 1B) – ESPORÂNGIOS ELIPSOIDES; G,H,I (ISOLADO 2C, , ISOLADO PB, ISOLADO 1B) – OÓSPOROS GLOBOSOS COM ANTERÍDIOS ANFÍGENOS.



FONTE: O autor (2017).



As medidas das estruturas assexuadas e sexuadas estão apresentadas na TABELA 1. Para os esporângios foram consideradas as medidas de comprimento (C) e largura (L) as quais variaram de 16,7 x 12 µm até 49,3 x 38,5 µm com média de 32,5 x 24,2 µm e a relação C/L variou de 1,4 a 1,7. Foi observada a formação de clamidósporos globosos em todos os isolados, sendo que estes se apresentaram terminais com diâmetro variando de 25,5 – 51,3 µm com média de 38,4 µm e espessura da parede variando de 1,3 – 4,7 µm com média 2,5 µm.

Em relação à compatibilidade dos isolados, todos se apresentaram heterotáticos e pertencentes ao tipo A2. Após cinco dias do pareamento com isolados do tipo A1 houve produção abundante de oósporos globosos, apleróticos, de anterídio anfigeno e sem ornamentações (FIGURA 5). Os oósporos tiveram seu diâmetro variando de 19,2 – 30 µm com média de 25 µm e o oogônio variou de 23,3 – 33,9 µm, com média de 30 µm.

TABELA 1 - DIMENSÕES DOS ESPORÂNGIOS, CLAMIDÓSPOROS E OÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* DE PLÁTANO E DE *P. cinnamomi* DE ARAUCÁRIA (ISOLADOS AR-21, AR-32, AR-40 E AR-51).

Isolado	Esporângios		Clamidósporos		Oósporo (µm)	Oogônio (µm)
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Diâmetro (µm)	Parede (µm)		
1B	17 <sup>A</sup> -32,7 <sup>B</sup> -49 <sup>C</sup> (±8) <sup>D</sup>	12-24,3-38,5 (±6,1)	30,5-39,8-49,7 (±4,7)	1,5-2,4-4,7 (±0,9)	20,3-24-27 (±2)	25,5-29-32 (±2)
2A	26,6-36-47,5 (±6,7)	30,6-26,4-34 (±4,3)	25,5-36,6-47,5 (±6,5)	1,3-2,4-4,6 (±0,8)	20,1-24,8-3 (±2)	23-29,9-32,9 (±2)
2C	16,7-30,8-47 (±7,5)	12,4-22-36,7 (±5,7)	26-38-51,3 (±5,8)	1,5-2,6-3,6 (±0,7)	22-25,4-29,5 (±2)	26,7-30-33,9 (±2)
PB	18,6-30,5-47 (±6)	13-23,2-35,3 (±5)	27,2-39-48,7 (±5)	1,5-2,5-4,2 (±0,7)	19,2-24-28,2 (±2)	23,8-29-33 (±2)
AR-21	31,3-43,6-62,5 (±7,3)	21,3-28,8-36 (±3,8)	28,8-38,8-50 (±3,8)	1,3-1,5-2,5 (±0,5)	21,2-24,9-28 (±1,8)	22-26,8-31,3 (±2,1)
AR-32	27,5-39-56,3 (±6,4)	18,8-25,2-40 (±4,5)	30-32,7-37,5 (±1,9)	1,3-1,3-1,3 (±0)	23,8-26-31,3 (±1,8)	21-24,6-28,8 (±1,7)
AR-40	27,5-36,9-52,5 (±5,2)	18,8-23,9-35 (±3,4)	30-35,4-51,6 (±3,9)	1,3-2-3,8 (±0,8)	21,3-25,3-30 (±1,9)	22,5-26,8-31 (±1,9)
AR-51	30-39,3-53,8 (±4,2)	20-25,5-31,3 (±2)	35-42,4-50 (±4,9)	1,2-1,4-2,5 (±4,9)	23,8-25-27,5 (±1,2)	25-26-28,8 (±1,2)

<sup>A</sup> Limite inferior; <sup>B</sup> Média de 50 esporângios; <sup>C</sup> Limite superior; <sup>D</sup> Desvio-padrão.

A comparação das sequências da região ITS-5.8S do rDNA do isolado sequenciado com sequências dessa região gênica disponíveis no GenBank para espécies de *Phytophthora* revelou maior similaridade com a espécie *P. cinnamomi*. Os índices de similaridade variaram de 98 a 99 % em relação aos depósitos de *P. cinnamomi* (AY96410). Na comparação realizada no Phytophthora- ID foi encontrado índice de 99% de similaridade com depósitos de *Phytophthora cinnamomi* (GU191210.1).

#### 4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo identificou-se *Phytophthora* associado com a morte de árvores de plátano. Com base nos caracteres morfológicos, fisiológicos e moleculares, os isolados obtidos neste estudo foram identificados como *Phytophthora cinnamomi* Rands, pertencente ao Grupo VI de Waterhouse (27) e clado 7b (3). Este é o primeiro relato desta espécie em árvores de plátano no Brasil. Este trabalho contribui com informações sobre a distribuição desta espécie no mundo, assim como, para a lista nacional de hospedeiros.

Na caracterização fisiológica dos isolados, não se verificou crescimento dos isolados nas temperaturas de 8 e 36 °C, sendo que estes apresentaram ótimo de crescimento na faixa de 20 a 28 °C, similar aos isolados de *P. cinnamomi* de araucária utilizados como padrões neste estudo. As temperaturas que limitaram o crescimento micelial dos isolados foram semelhantes às para *P. cinnamomi* (29). Em estudo realizado por Solana (24), foram encontrados resultados similares para isolados de *P. cinnamomi* provenientes de *Quercus* spp., na Espanha. Isolados de *P. cinnamomi* da África do Sul e da Austrália também apresentaram seu crescimento ótimo a 24 °C (14). Segundo Erwin e Ribeiro (9), a variável temperatura, é um critério bastante utilizado na caracterização de *Phytophthora*, uma vez que as espécies possuem diferentes temperaturas máximas e mínimas de crescimento, de forma que essa característica pode auxiliar a separar espécies morfológicamente semelhantes. Zentmeyer (29) relatou que as colônias dessa espécie tem seu crescimento máximo entre os 24 a 27 °C e tem seu crescimento reduzido acima de 33 °C e abaixo de 10 °C.

O aspecto das colônias não variou entre os isolados, sendo todos classificados como cotonoso de micélio pouco denso. Dentre os caracteres de maior

relevância na taxonomia do gênero *Phytophthora* encontram-se a morfologia e dimensão das estruturas sexuadas e assexuadas. Observou-se a formação, em extrato de solo, de esporângios não papilados e predominantemente ovóides e elipsoides, sendo estes persistentes. As hifas não septadas apresentaram a formação abundante de dilatações com formação de clamidósporos globosos. Estas características correspondem ao descrito para a espécie *P. cinnamomi* Rands (9,11) e corroboram com as características definidas por Waterhouse (27) para *P. cinnamomi* e também com resultados obtidos por outros autores (12, 23, 26).

As dimensões dos esporângios dos isolados de *Phytophthora* sp. deste estudo foram em média de 32,5 x 24,2 µm assemelhando-se com os padrões de isolados de araucária de *P. cinnamomi* utilizados neste estudo. Zentmeyer et al. (30) definiram para *P. cinnamomi* uma amplitude de 43 – 75 x 24 – 47 µm para estas estruturas. Estes autores ressaltam que pode haver uma grande variação quanto a estes parâmetros morfológicos para esta espécie, uma vez que os mesmos não permanecem estáveis. Resultados similares foram encontrados por Eggers et al. (8), estudando isolados de *P. cinnamomi* provenientes de árvores de carvalho na Austrália.

Os clamidósporos são estruturas de sobrevivência produzida por algumas espécies de *Phytophthora*, havendo 35 espécies que formam esta estrutura dentre todas as descritas para o gênero (9). De acordo com Stamps (25), as características morfológicas dos clamidósporos podem ser usadas como caráter taxonômico para diferenciar algumas espécies de *Phytophthora*. Os clamidósporos de *P. cinnamomi* são globosos e se caracterizam por suas paredes que são consideradas mais espessas quando comparadas a outras espécies deste gênero (29). Foi observada a formação de clamidósporos globosos e terminais nos quatro isolados, com diâmetro médio de 38,4 µm, assemelhando-se com isolados de araucária de *P. cinnamomi* utilizados como padrões neste estudo. Em isolamentos provenientes de árvores de *P. acerifolia* na Itália, Pilotti et al. (19) encontraram valores de dimensões aproximados para esporângios e clamidósporos.

Em relação às estruturas sexuadas, os quatro isolados em estudo apresentaram-se heterotáticos, produzindo o tipo de compatibilidade A2. De acordo com Zentmeyer (29), o tipo A2 está amplamente distribuído, enquanto que o tipo A1 não é muito comum. Os oósporos formados apresentaram-se apleróticos, de anterídio anfígeno de diâmetro de em média 25 µm e oogônio medindo em média 30

µm. Estes mesmos resultados foram encontrados por outros autores em hospedeiros diferentes do presente estudo (2,8,26). Segundo Erwin e Ribeiro (9), os oósporos variam de 19 – 54 µm e o oogônio, aplerótico, variou de 21 - 58 µm, sendo uma estrutura formada pelo pareamento de dois tipos de compatibilidade diferentes (A1 e A2).

O sequenciamento da região ITS de um dos isolados revelou 99 % de similaridade do isolado em estudo com *Phytophthora cinnamomi*. As sequências de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2 do gene ribossomal 5.8S do rDNA têm sido utilizadas na taxonomia de *Phytophthora* visando um rápido diagnóstico. Estas regiões são amplamente utilizadas para estudos filogenéticos por apresentarem variações entre espécies dentro do gênero, mas nenhuma ou muita variação intraespecífica (5). As regiões ITS1 e ITS2 divergem o suficiente para ser informativas na distinção de espécies de *Phytophthora* (6). Além disso, estas regiões foram extensivamente sequenciadas para a maioria das espécies de *Phytophthora* e outros fungos relacionados (6). Estudos comparativos das sequências nucleotídicas de genes do RNA ribossomal permitem analisar e classificar isolados de espécies fúngicas com base filogenética em vários níveis taxonômicos (28). Estes estudos têm elucidado a ligação evolucionária de muitas espécies de oomicetos e permitem um estudo mais criterioso sobre a evolução de muitas destas espécies (1,9).

#### 4.5 CONCLUSÕES

Por meio das análises morfofisiológica, patogênica e molecular, o agente causal da morte de árvores de plátano foi identificado como *Phytophthora cinnamomi* Rands.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

1. Appiah, A.A.; Flood, J.; Archer, S.A.; Bridge, P.D. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. **Plant Pathology** 53(2): 209-219, 2004
2. Besoain, X. et al. Efecto del Periodo de Inundación en el Desarrollo de la Tristeza del Palto (*Persea americana*), causada por *Phytophthora cinnamomi*. **Ciencia e Investigación Agraria** 32(2): 97-103, 2005.
3. Blair, J.E.; Coffey, M.D.; Park, S.Y.; Geiser, D.M.; Kang, S. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. **Fungal Genetics and Biology** 45 (3): 266-277, 2008.

4. Cahill, D.M.; Rookes, J.E.; Wilson, B.A.; Gibson, L.; McDougall, K.L. Turner Review No. 17. *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. **Australian Journal of Botany** 56: 279–310, 2008.
5. Chowdappa, P. et al. Identification of *Phytophthora* species affecting plantation crops by RFLP of PCR-amplified internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. **Current Science** 85:34-36, 2003.
6. Cooke, D.E.L.; Drenth, A.; Duncan, J.M.; Wagels, G.; Brasier, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. **Fungal Genetics and Biology** 30:17-32, 2000.
7. Crandall, B.S. Root disease of some conifers and hardwoods caused by *Phytophthora cambivora* (*P. ctnnamomi*). **Plant Disease Reporter** 20: 202-204, 1936.
8. Eggers, J.E.; Balci, Y.; MacDonald, W.L. Variation among *Phytophthora cinnamomi* isolates from oak forest soils in the eastern United States. **Plant Disease** 96(11): 1608-1614, 2012.
9. Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, 1996.
10. Frezzi; Mariano, J. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental** 4: 47-133, 1950.
11. Gallegly, M.E.; Hong, C. **Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints**. St. Paul, Minnesota, 2008.
12. Gallegos, T.; Diana, E. Identificación Molecular de *Phytophthora* spp. en el cultivo de Aguacate (*Persea americana* M.), de las principales zonas productoras del Ecuador. Tesis, Facultad de Ingeniería Agronómica, 2013.
13. Greenhalgh, F.C., Challen, D.I. Trunk rot of oriental plane trees caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Australasian Plant Pathology** 8:50, 1979.
14. Hüberli, D.; Tommerup, I.C.; Dobrowolski, M.P.; Calver, C.; Hardy, G.E. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. **Mycological Research** 105(9): 1053-1064, 2001.
15. Kroon, L.P.N.M.; Brouwer; H.; Cock, A.W.A.M.; Govers, F. The Genus *Phytophthora* Anno 2012. **Phytopathology** 102: 348-364, 2012.
16. Linde, C.; Drenth, A.; Wingfield, M.J. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. **European Journal of Plant Pathology** 105:667-680, 1999.
17. Newhook, F.J.; Podger, F.D. The role of *Phytophthora cinnamomi* in Australian and New Zealand forests. **Annual Review of Phytopathology** 10: 299-326, 1972.

18. Ono, E.O.; de Barros S.A., Rodrigues, J.D., et al. Enraizamento de estacas de *Platanus acerifolia*, tratadas com auxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 29(9): 1373-1380, 1994.
19. Pilotti, Massimo; et al. *Phytophthora cinnamomi* causing stem canker and root rot of nursery-grown *Platanus* *acerifolia*: first report in the Northern hemisphere. **Phytopathologia Mediterranea** 53(1): 75, 2014.
20. Rehder, A. **Manual of cultivated trees and shrubs**, New York ed, 1: 558-578, 1927.
21. Santos, A. F. dos; Luz, E.D.M.N.; Reis, A. *Phytophthora* spp.: Distribuição e associação com espécies florestais. **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 47, 2014. Available in: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/993792>
22. Santos, M.V.O. *Phytophthora cinnamomi* na rizosfera de cultivos agrícolas no Sul da Bahia. **Summa Phytopathologica** 40(1), 2014.
23. Sepúlveda-Chavera, Germán, et al. Presence of *Phytophthora cinnamomi* Rands. In avocado orchards in Azapa and Codpa valleys, Chile. **IDESIA** 31(2): 41-47, 2013.
24. Solana, J.E.; Sánchez et al. Incidencia de la podredumbre radical causada por "*Phytophthora cinnamomi*" en masas de "Quercus" en Andalucía. **Boletín de Sanidad Vegetal** 29(1): 87-108, 2003.
25. Stamps, D.J. et al. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. **Mycological Papers** 162: 1-28, 1990.
26. Tziros, George T, Diamandis, Stephanos. Identification of *Phytophthora cinnamomi* as the cause of decline and death in *Taxus baccata* in Greece. **Australasian Plant Disease Notes** 8(1): 153-155, 2013.
27. Waterhouse, G.M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K. **Mycological Papers** 92, 1963.
28. White, T.J.; Bruns T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: **PCR protocols: a guide to methods and applications**, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, 1990.
29. Zentmyer, G.A. **The World of Phytophthora: Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology**, The American Phytopathological Society, Minesota, 1987.
30. Zentmyer, G.A; Menge and H.D. OHR. *Phytophthora* root rot. In: Ploetz, R.C.; Zentmyer, G.A.; Nishijima, W.T.; Rohrbach, K.G.; H.D. Ohr. (Ed). **Compendium of Tropical Fruit Diseases**. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. p. 77-79, 1994.



### 5 CAPÍTULO III – PATOGENICIDADE DE *Phytophthora cinnamomi* E *P. nicotianae* EM ARAUCÁRIA, ERVA-MATE, CEDRINHO E RIZOSFERA DE ÁRVORES DE PINUS

Espécies do gênero *Phytophthora* são mundialmente conhecidas pela ameaça que constituem a sustentabilidade de ecossistemas florestais. Diferentes espécies estão associadas a hospedeiros florestais, de uso econômico ou em ambientes de floresta nativa e os impactos causados por estas espécies são descritos em diferentes regiões do mundo, com destaque para *P. cinnamomi* em ecossistemas na Austrália, em árvores de castanha e carvalho na Europa e nos Estados Unidos. No Brasil, estudos relacionados à *P. cinnamomi* em espécies florestais são escassos e não se conhece sua lista de hospedeiros oficial, apesar de relatos incluírem algumas espécies florestais, como pinus e eucalipto, e estudos recentes apontaram a presença do patógeno na rizosfera de plantas endêmicas na Bahia e também causando doença em árvores de araucária, espécie nativa ameaçada de extinção. Dado o exposto, o trabalho objetivou identificar espécies de *Phytophthora* associadas à mudas de erva mate, araucária e árvores de pinus, e caracterizar e identificar isolados de *Phytophthora* provenientes de árvores de cedrinho. Foram realizados os isolamentos em meio seletivo para *Phytophthora*, de solo e raízes de plântulas e mudas de erva-mate, araucária e mudas de pinus. Foram realizados, também, testes de patogenicidade em mudas de araucária, erva-mate e pinus. Foram avaliados, o crescimento micelial dos isolados em oito temperaturas, formação e dimensões de estruturas sexuais e assexuais e foi realizada a análise molecular com base na região ITS do DNA. Obteve-se três isolados de araucária, quatro isolados de erva-mate e quatro isolados de pinus, e com base nas características morfofisiológicas e moleculares, estes foram identificados como *P. cinnamomi* Rands. O isolado de cedrinho foi identificado como *P. nicotianae*. Este é o primeiro relato de *P. cinnamomi* associado a erva mate, e o primeiro relato de *P. nicotianae* associado a cedrinho no Brasil.

**Palavras-chave:** Oomiceto, Etiologia, *Ilex paraguariensis*, *Cupressus lusitanica*



## **PATHOGENICITY OF *Phytophthora cinnamomi* AND *P. nicotianae* TO ARAUCARIA, YERBA MATE, PINE TREES RHIZOSPHERE AND CYPRESS TREES**

### **ABSTRACT**

Species of the genus *Phytophthora* are known worldwide for the threat that they constitute to the sustainability of forest ecosystems. Different species are associated to forest hosts, economically or in native forest environments and the impacts caused by these species are described in different regions of the world, with emphasis on *P. cinnamomi* in ecosystems in Australia, on chestnut and oak trees in Europe and the United States. In Brazil, studies related to *P. cinnamomi* in forest species are scarce and their official host list is not known, although reports include some forest species, such as pinus and eucalyptus, and recent studies have pointed out the presence of the pathogen in the rhizosphere of endemic plants in Bahia and also causing disease in trees of araucaria, a native species threatened of extinction. Given the above, the objective of this work was to identify *Phytophthora* species associated with yerba mate, araucaria and pinus trees, and to characterize and identify *Phytophthora* isolate from cypress tree. Isolation was carried out in a selective medium for *Phytophthora*, from soil and roots of seedlings of yerba mate, araucaria and rhizosphere os pine seedlings. Pathogenicity tests were also carried out on araucaria, yerba mate and pine seedlings. For all isolates, mycelial growth at eight temperatures, the formation and dimensions of sexual and asexual structures, and the molecular analysis based on the ITS region of the DNA were evaluated. Three isolates of araucaria, four isolates of yerba mate and four isolates of pine were obtained, and based on morphological and molecular characteristics, these were identified as *P. cinnamomi* Rands. The cypress isolate was identified as *P. nicotianae*. This is the first report of *P. cinnamomi* associated with yerba mate, and the first report of *P. nicotianae* associated with cypress in Brazil.

**Key-words:** Oomycete, ITS, Etiology, *Ilex paraguariensis*, *Cupressus lusitanica*

## 5.1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Phytophthora* são conhecidas por atacar centenas de espécies florestais, arbustivas e agrícolas ao redor do mundo, causando podridões nas raízes mais finas, podridões e cancos no colo, necrose nas folhas e podridão dos frutos (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Globalmente, estima-se que mais de 66% de todas as doenças de raízes e mais de 90% das doenças de podridão de colo de plantas lenhosas sejam causadas por espécies de *Phytophthora* (TSAO, 1990).

Os estudos sobre espécies patogênicas de *Phytophthora* em ecossistemas naturais e florestas começaram na Austrália na década de 1960, com a descoberta da espécie invasora *P. cinnamomi* Rands, ameaçando algumas das comunidades de plantas mais ricas do mundo por mais de um século na Austrália Ocidental e Victoria (PODGER et al., 1965; PODGER & NEWHOOK, 1971; SHEARER & TIPPETT, 1989; MARKS & SMITH, 1991; SHEARER; CRANE; COCHRANE, 2004; HARDHAM, 2005). Desde a década de 1990, o estudo de *P. cinnamomi*, outras espécies de *Phytophthora* envolvidas no declínio de carvalho no sul e centro da Europa (BRASIER; ROBREDO; FERRAZ, 1993; JUNG; BLASCHKE, 1996; JUNG; BLASCHKE; OSSWALD, 2000), a descoberta de *P. ramorum* causando a ‘morte súbita do carvalho’ no oeste dos EUA (RIZZO; GARBELOTTO; DAVIDSON, 2002), o ressurgimento da doença da tinta castanha e a mortalidade generalizada de amieiros em toda a Europa devido ao complexo híbrido *P. alni* (VETTRAINO; NATILI; ANSELM, 2001; BRASIER; KIRK; DELCAN, 2004; JUNG; BLASCHKE 2004; HUSSON; AGUAYO; REVELLIN, 2015) levantaram o interesse de muitos fitopatologistas para este importante gênero causador de doenças.

No Brasil, sete espécies de *Phytophthora* foram registradas em espécies florestais (SANTOS; LUZ; REIS, 2014). Segundo levantamento realizado por Santos et al. (2014), *P. boehmeriae* está associada à gomose generalizada da acácia-negra, seu único hospedeiro, tendo sua distribuição geográfica limitada à região sul do Brasil; *P. capsici* ataca as plantações de seringueira no sudeste da Bahia, além de outras 20 espécies de cultivos agrícolas pertencentes a sete famílias e é encontrada em todas as regiões brasileiras; *P. cinnamomi* já foi encontrada causando doença em araucária tendo 12 hospedeiros entre plantas cultivadas e nativas. Ainda, segundo estes autores, *P. citrophthora* é um dos agentes da requeima da

seringueira, ocorrendo com baixa frequência nos plantios da Bahia, e também em São Paulo, infectando 13 hospedeiros pertencentes a quatro famílias; *P. heveae* infecta plantas cultivadas (cacaueiro, cajueiro) e nativas (castanheira-do-pará e plantas endêmicas da Mata Atlântica); *P. nicotianae* é a espécie mais comum no Brasil, ocorrendo em todas as regiões brasileiras, e ataca 34 hospedeiros pertencentes a 22 famílias. É o agente causal da gomose basal da acácia-negra. *P. palmivora* está presente em várias regiões brasileiras sendo seus dois principais hospedeiros a seringueira e a pupunheira, na seringueira ocorre em baixa frequência, enquanto que na pupunheira é a única espécie patogênica a este hospedeiro.

Espécies de *Phytophthora* são distribuídas, relativamente abundantes, muito diversas e pouco entendidas em ecossistemas nativos (HANSEN et al, 1986). Mesmo em ecossistemas agrícolas, mais de uma espécie de *Phytophthora* pode estar presente, cada uma respondendo a diferentes estímulos ambientais e presumivelmente interagindo com diferentes genes hospedeiros (HANSEN, 2015). Dessa forma, não deveria ser surpreendente que ecossistemas mais complexos, com diversas comunidades de plantas ocupando habitats ambientalmente distintos, abriguem muitas espécies de *Phytophthora*. O solo da floresta, riachos e copas das árvores ao redor do mundo estão sendo explorados para o estudo da diversidade de *Phytophthora* (HANSEN et al., 1986).

O Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo-PR, tem recebido amostras de rizosfera e de plantas sintomáticas de vários hospedeiros florestais como araucária, pinus, plátano, erva-mate, cedrinho de onde se tem consistentemente isolado *Phytophthora*. As mudas de araucária, erva-mate e pinus oriundas de casa de vegetação, apresentavam sintomas de podridão de raízes e morte das plantas.

Tendo em vista o exposto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar isolados de *Phytophthora* encontrados em amostras da região sul do Brasil de cedrinho (*Cupressus lusitanica* Mill.), erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil), pinus (*Pinus taeda* L.) e araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), para posterior identificação específica dos isolados. Esta caracterização e posterior identificação também objetiva contribuir com o acréscimo de hospedeiros na lista deste gênero no Brasil.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Origem dos isolados

Neste estudo foi incorporado o isolado de cedrinho que pertence à coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas, e foi obtido a partir de árvores sintomáticas de cedrinho, tendo sua patogenicidade foi confirmada em estudos prévios (dados não publicados). Os isolados de erva mate, araucária foram obtidos a partir de amostras de raízes e colo de mudas sintomáticas (podridão de raízes) e solo da rizosfera das árvores de pinus. As amostras de solo e as raízes foram colocadas em recipiente contendo água e fruto de abacate como isca, conforme metodologia descrita no item 4.2.1. As raízes e pedaços do colo das plantas foram cortados em fragmentos e desinfestados em álcool 70% por 10 s, hipoclorito de sódio 0,5% por 30 s e depois lavados em água ultrapurificada. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri (90 mm de diâmetro) com meio corn meal ágar seletivo para *Phytophthora* (2,5 mL de PCNB, 2 mL de tiofanato metílico, 2 mL de ampicilina, 1 mL de cloranfenicol e 0,5 mL de pimaricina/ 250 mL de meio). As placas foram mantidas em câmara BOD a 24 °C por quatro dias, no escuro. Após esse período, verificou-se a presença de hifas cenocíticas típicas de *Phytophthora*, e os isolados obtidos foram repicados para placas de Petri contendo meio V8-ágar (200 mL de suco V8, 3 g de CaCO<sub>3</sub>, 18 g de ágar e 800 mL de água ultrapurificada). Depois de purificados os isolados foram incorporados à coleção de Fungos e Oomicetos Florestais do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa- Florestas, mantidos em frascos com água, pelo método de Castellani.

### 5.2.2 Teste de patogenicidade

Para avaliação da patogenicidade dos isolados de erva mate, araucária e pinus foram realizados testes em mudas das respectivas espécies. Para os testes, os isolados foram cultivados em meio V8-ágar a 24°C, sob fotoperíodo (12h), por cinco dias. Foram utilizadas mudas de araucária, erva mate e pinus de 6 meses de idade, em mantidas em tubetes com vermiculita expandida e adotando-se os tratamentos culturais de viveiros da Embrapa Florestas. As mudas foram previamente limpas com álcool 70% na região do colo da planta. Foi feito um ferimento superficial com estilete na região onde se inseriu um disco de cinco mm de diâmetro de meio

contendo micélio com crescimento ativo de cada isolado e coberto com fita branca. Foram realizadas cinco repetições para cada isolado e o delineamento foi inteiramente casualizado. A testemunha recebeu um disco de cinco mm de meio de cultura V8-ágar o patógeno. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e as avaliações foram feitas semanalmente durante três meses e, posteriormente, as plantas que apresentaram sintomas típicos (amarelecimento e murcha) foram submetidas ao procedimento de re-isolamento como descrito no item 5.2.1.

### 5.2.3 Caracterização morfofisiológica

#### 5.2.3.1 Aspecto das colônias

Os isolados foram incubados em meio V8-ágar em BOD a 24 °C em ausência de luz para a avaliação do aspecto das colônias, por sete dias (três repetições por isolado). O aspecto das colônias foi classificado em: cotonoso, rosáceo, estrelado; e o micélio classificado como: denso, pouco denso e aéreo, de acordo com o estabelecido na literatura (ERWIN, RIBEIRO, 1996).

#### 5.2.3.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial

Foram realizados ensaios de curva de crescimento micelial nas temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36 °C. Os isolados foram incubados a 24 °C em meio V8-ágar por cinco dias e, posteriormente, foram repicados discos de meio contendo micélio ativo de cinco mm de diâmetro para o centro de placas contendo o mesmo meio. As placas para o experimento foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado em câmara BOD, com três repetições por isolado. As placas foram incubadas nas oito temperaturas, em ausência de luz, e o crescimento foi mensurado ao terceiro, quinto e sétimo dia após a instalação. As medições foram realizadas nos sentidos diametralmente opostos do crescimento radial da colônia, utilizando-se um paquímetro digital (Starrett®, série 799). O diâmetro da colônia foi expresso pela média aritmética das duas medidas e foi feita a regressão e posterior derivada da equação das curvas para se obter a temperatura ótima.

#### 5.2.3.3 Avaliação de estruturas assexuadas

As estruturas assexuadas, tais como esporângios e clamidósporos dos isolados, foram avaliadas quanto à forma, disposição, papilas e dimensões, para os esporângios e presença ou ausência e dimensões, para clamidósporos, de acordo com a literatura (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Para a produção dos esporângios, os isolados foram incubados a 24 °C por cinco dias no escuro em placa de Petri contendo meio V8-ágar. Posteriormente, discos de cinco mm de diâmetro de meio contendo micélio com crescimento ativo foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo meio V8 líquido, e estes foram incubados em BOD a 24 °C por sete dias em luz contínua. Após este período o micélio crescido foi lavado com água ultrapurificada por 3 vezes e transferido para placas contendo 10 mL de extrato de solo filtrado não esterilizado (1000 mL de água ultrapurificada/ 40 g de solo) segundo metodologia proposta por Erwin e Ribeiro (1996), e incubado a 24 °C sob luz contínua, por 72 h. Em seguida, foram feitas lâminas permanentes do micélio fragmentado, as quais foram utilizadas para observação em microscópio óptico ZEISS® Axio Scope no aumento de 400x. Neste aumento, os esporângios foram caracterizados e suas dimensões aferidas, sendo realizadas medições de 50 estruturas por isolado. Nas lâminas confeccionadas a partir da massa micelial, bem como em lâminas confeccionadas a partir de placas de Petri contendo a colônia, foi possível avaliar também tipo de hifa e os clamidósporos, sendo realizadas também medições de 50 estruturas por isolado, quando este foi observado.

#### 5.2.3.4 Avaliação de estruturas sexuadas

Os isolados foram classificados quanto ao seu grupo de compatibilidade, avaliando-se a formação da estrutura sexuada, o oósporo e quanto ao sua característica homotática ou heterotática. Para tanto, os isolados foram incubados em meio V8-ágar a 24 °C no escuro por cinco dias e posteriormente foram pareados em placas contendo o mesmo meio com os padrões A1 e A2 de *P. frigid*, pertencentes à coleção do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa-Florestas (Colombo, PR). As placas foram incubadas a 24 °C no escuro por 10 dias e, posteriormente, procedeu-se o preparo de lâminas com corante lactoglicerol azul de metileno para observação em microscópio óptico ZEISS® Axio Scope no aumento de

400x. Foram feitas medições de 50 oósporos formados e estes foram avaliados quanto a sua morfologia, bem como a posição do anterídio.

#### 5.2.4 Caracterização molecular

Para a identificação molecular, o isolado de cedrinho, um isolado de erva mate, um isolado de araucária e um isolado de pinus foram escolhidos para se proceder primeiramente a amplificação e sequenciamento da região ITS. Para a extração do DNA os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio V8-água por cinco dias e, posteriormente, dez discos de meio contendo micélio foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo meio líquido de V8. Os frascos foram colocados sob agitação contínua por 24 h e, então, o micélio formado foi retirado, lavado com água ultrapura e seco em papel filtro esterilizado. Foram pesadas 40 mg de micélio, colocadas em microtubos e logo após, foi adicionada a solução de lise celular contida no kit de extração. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por uma hora e posteriormente seguiu-se o protocolo de extração do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para a identificação dos isolados, foram amplificadas as regiões ITS1, ITS2 e gene 5.8S do DNA ribossômico empregando-se os pares de *primers* ITS6/ITS4 (White et al, 1990). A reação de PCR para a região ITS dos isolados foi realizada com um volume final de 15 µL sendo tampão de reação 1X, cloreto de magnésio à 1,5 mM, DNTP à 0,2 mM, primers à 0,4 mM e 0,75 U de Taq polimerase. Para a amplificação foram realizados 35 ciclos que consistiam de 1 min a 94 °C para desnaturação, 1 min a 55 °C para anelamento e 1 min a 72 °C para extensão com 10 min de extensão final. Os produtos da PCR foram submetidos à análise em gel de agarose 1,5% para a visualização dos fragmentos amplificados de interesse. Após a PCR, os fragmentos foram purificados e procedeu-se o sequenciamento utilizando-se o kit BigDye *Terminator* v3.1 Cycle Sequencing, conforme recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems), na UFPR. As sequências obtidas foram comparadas com acessos depositados no GenBank utilizando-se o “Nucleotide BLAST” no servidor do NCBI e com sequências depositadas no *Phytophthora*-ID, para identificação.



## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Isolados e teste de patogenicidade

Foram obtidos quatro isolados de erva mate (31A, 31B, 32A e 32B), três isolados de araucária (AM34, AM35 e AM36) e quatro isolados da rizosfera de pinus (7, 7A, 7B e 7C). A patogenicidade dos isolados foi comprovada nos testes todos os hospedeiros. Todos os isolados foram patogênicos para as mudas de araucária, erva mate e pínus. Os sintomas iniciais foram de murcha apical, seguido de amarelecimento das acículas e folhas e posterior morte da muda. Nas mudas de erva mate, a incidência variou de 40 a 80%, 40 dias após a inoculação. Nas mudas de araucária a incidência foi de 100% para todos os isolados, causando morte de todas as plantas, 30 dias após a inoculação do patógeno. Para as mudas de pinus foi verificada incidência de 40 a 60%, 40 dias após a inoculação. As testemunhas dos testes nos três hospedeiros não apresentaram sintomas, com 0% de incidência.

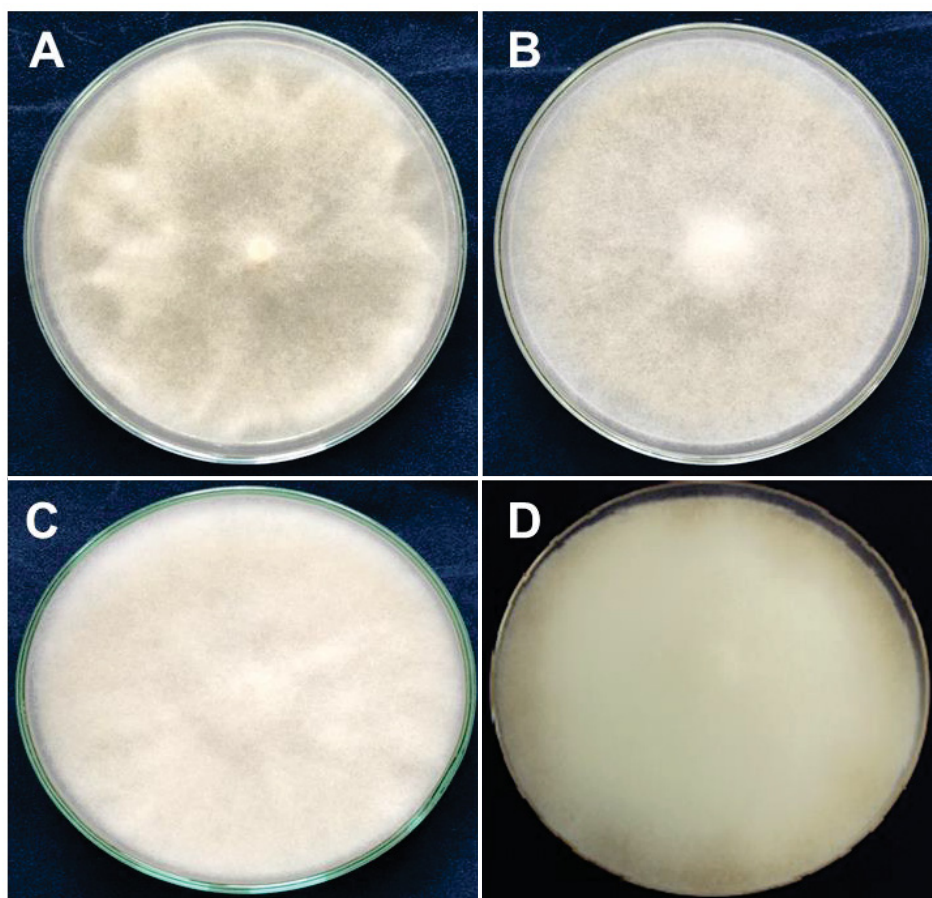
### 5.3.2 Caracterização morfofisiológica

Os quatro isolados de erva mate deste estudo tiveram colônias de micélio hialino, de aspecto de padrão rosáceo e micélio aéreo e pouco denso (TABELA 1). Os três isolados de araucária e os quatro isolados de pinus obtidos apresentaram padrão cotonoso e micélio denso. O isolado de cedrinho apresentou micélio aéreo e denso de padrão cotonoso (FIGURA 1).

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS CULTURAIS, DE ESPORÂNGIOS E CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* spp. DE ERVA MATE, ARAUCÁRIA, PINUS E CEDRINHO EM MEIO DE CULTURA V8-ÁGAR

ISOLADOS	PADRÃO DE COLÔNIA	CARACTERÍSTICA DO MICÉLIO	FORMA DOS ESPORÂNGIOS	PRESENÇA DE CLAMIDÓSPOROS
<b>ERVA MATE</b>				
AM31A	Rosáceo	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide	Presente
AM31B	Rosáceo	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide	Presente
AM32A	Rosáceo	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide	Presente
AM32B	Rosáceo	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide	Presente
<b>ARAUCÁRIA</b>				
AM34	Cotonoso	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide	Presente
AM35	Cotonoso	Denso	Maioria elipsoide	Presente
AM36	Cotonoso	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide	Ausente
<b>PÍNUS</b>				
7	Cotonoso	Denso	Maioria elipsoide	Ausente
7 A	Cotonoso	Denso	Maioria elipsoide	Presente
7 B	Cotonoso	Denso	Maioria ovoide	Presente
7 C	Cotonoso	Denso	Maioria elipsoide	Ausente
<b>CEDRINHO</b>				
Ced	Cotonoso	Aéreo, denso	Maioria ovoide, presença de globoso, obpiriforme	Presente

FIGURA 1 - MORFOLOGIA DAS CULTURAS DE *Phytophthora* sp. DE ERVA MATE (A), ARAUCÁRIA (B), PÍNUS (C) E CEDRINHO (D) A 24 °C COM SETE DIAS DE CULTIVO EM MEIO V8-ÁGAR: (A – 32B) PADRÃO ROSÁCEO, (B – AM35, C – 7, D – Ced) PADRÃO COTONOSO.



FONTE: O autor (2018).

A temperatura produziu efeito no crescimento das colônias dos isolados de erva mate, araucária, rizosfera de pinus e cedrinho. Nenhum dos isolados apresentou crescimento micelial nas temperaturas de 8, 32 e 36 °C. A temperatura ótima média de crescimento dos isolados dos três hospedeiros foi de 21 °C. O isolado de cedrinho apresentou crescimento micelial a 8 °C, atingindo o máximo crescimento na faixa entre 28 e 32 °C, não apresentando crescimento a 36 °C. O crescimento micelial dos isolados e a temperatura ótima estão representados na FIGURA 2.

FIGURA 2 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora* spp. DE ERVA MATE (31A, 31B, 32A, 32B), ARAUCÁRIA (AM34, AM35, AM36) PINUS (7, 7A, 7B, 7C) E CEDRINHO (Ced), EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.

(continua)

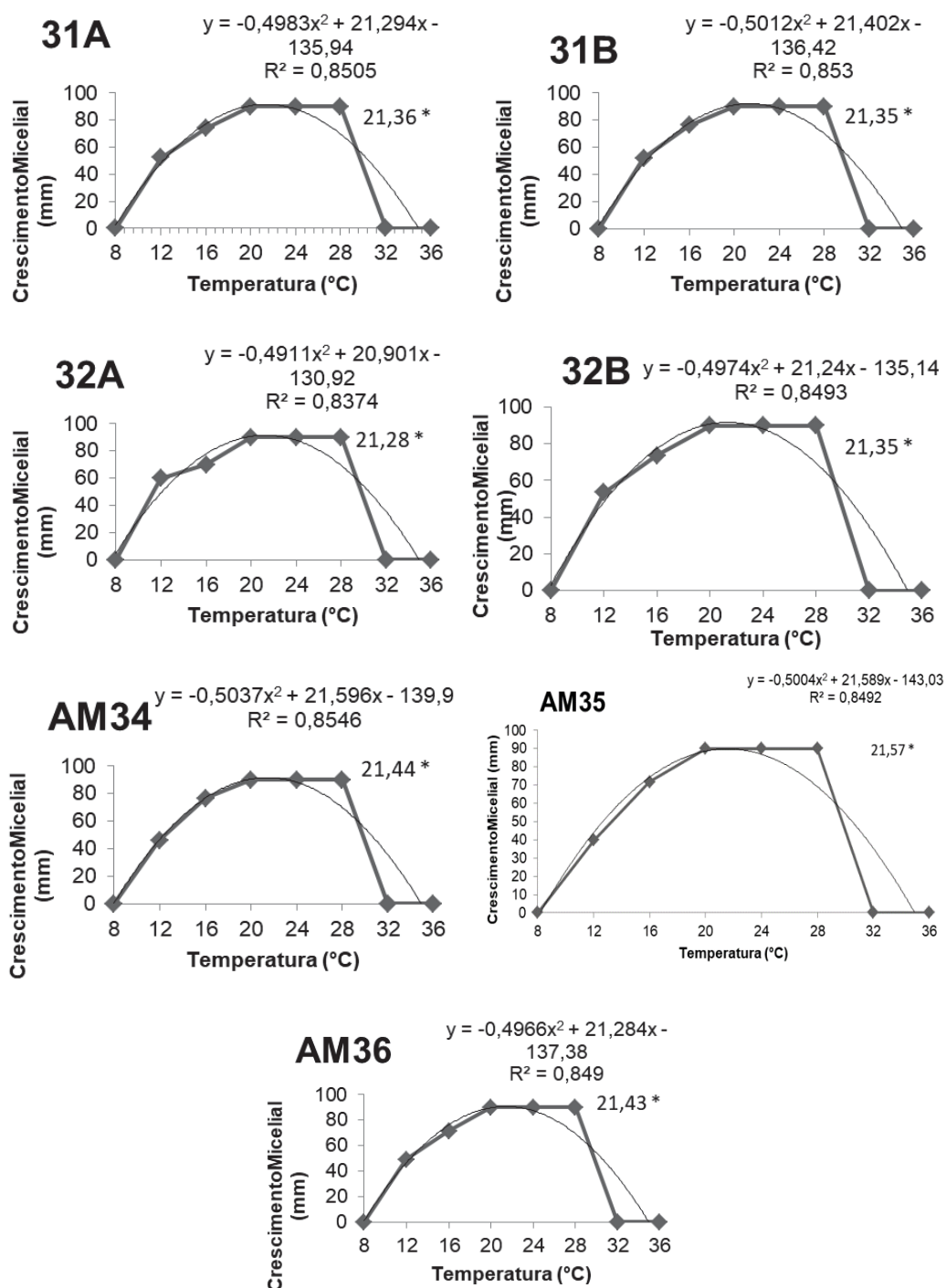
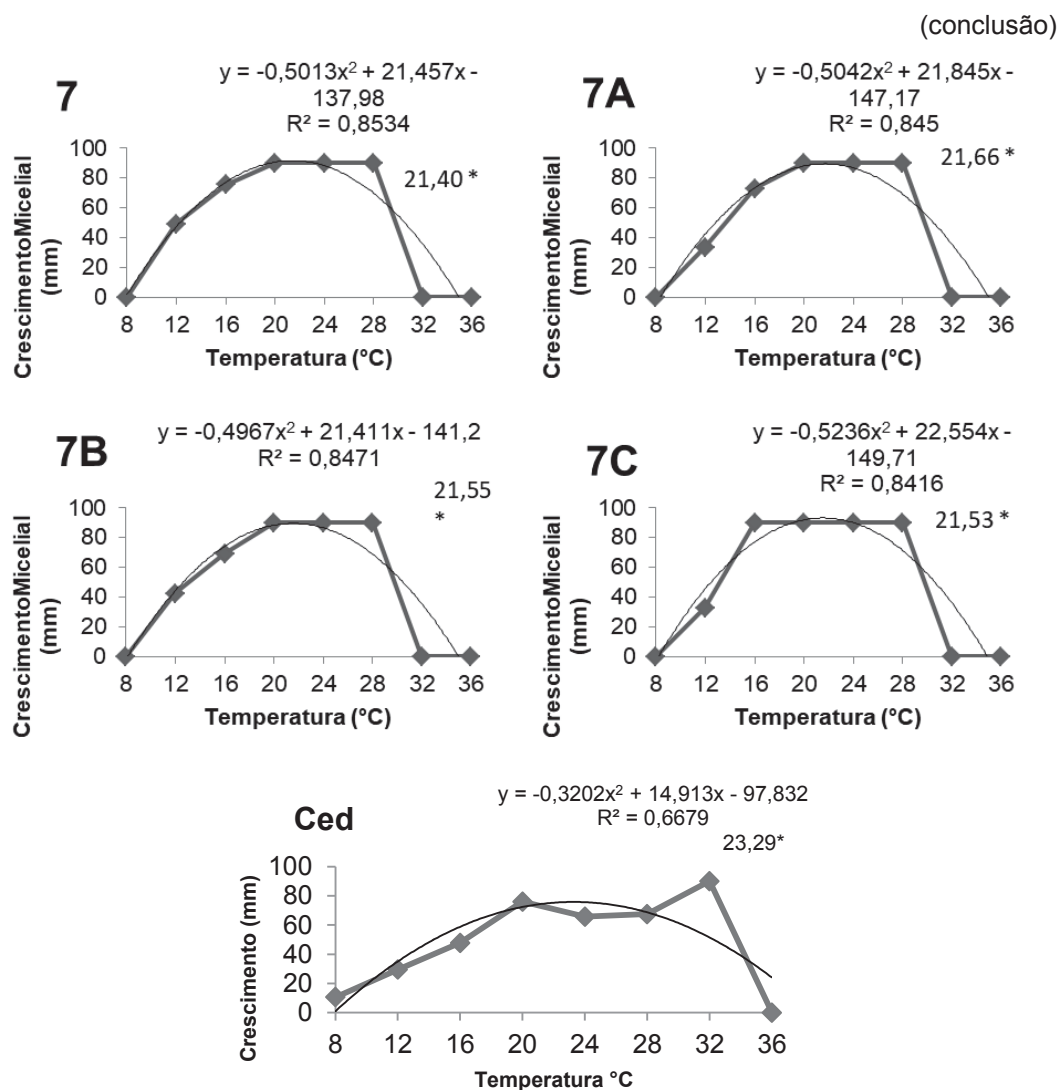


FIGURA 2 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora* spp. DE ERVA MATE (31A, 31B, 32A, 32B), ARAUCÁRIA (AM34, AM35, AM36) PÍNUS (7, 7A, 7B, 7C) E CEDRINHO (Ced), EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SUCEDIDOS POR (\*) REPRESENTAM O VALOR DA TEMPERATURA ÓTIMA.



Os isolados de erva mate, araucária e pinus apresentaram micélio hialino, hifas cenocíticas e a presença de dilatações esféricas. Todos os isolados avaliados apresentaram produção abundante de esporângios em extrato de solo não autoclavado sob luz contínua. Os esporângios dos isolados de erva mate, araucária e pinus apresentaram-se persistentes, não papilados e formados individualmente. As medidas dos esporângios e clamidósporos estão apresentadas na TABELA 2.

TABELA 2 - DIMENSÕES DOS ESPORÂNGIOS E CLAMIDÓSPOROS DE *Phytophthora* spp. DE ERVA MATE, ARAUCÁRIA, PÍNUS E CEDRINHO EM EXTRATO DE SOLO.

Isolado	ESPORÂNGIO (µm)			CLAMIDÓSPORO (µm)	
	COMPRIMENTO (C)	LARGURA (L)	C/L	DIÂMETRO	ESPESSURA DA PAREDE
<b>ERVA MATE</b>					
AM31A	20,7 <sup>A</sup> -43,4 <sup>B</sup> - 74,7 <sup>C</sup> (±12,9) <sup>D</sup>	13,7-30,8-47,4 (±7,5)	1,4	27,5-41,8-54,4 (±7,4)	1,5-2,1-3 (±0,4)
AM31B	20,8-53,7-76,8 (±12,8)	15-36,7-55,3 (±7,4)	1,5	29,4-38,5-47,2 (±4,4)	1-1,9-3 (±0,5)
AM32A	17,1-42,9-70 (±12,9)	12,6-30,1-41,2 (±8)	1,4	12-21,9-40,4 (±7,7)	1-1,3-2,5 (±0,4)
AM32B	17-27,5-55,1 (±7,6)	10,2-18,6-33,5 (±4,3)	1,5	24-40,4-52 (±6,8)	1-1,8-3 (±0,5)
<b>ARAUCÁRIA</b>					
AM34	20,2-45,7-74 (±12,6)	13,8-31,7-41,6 (±7,8)	1,4	31,4-41,3-48,1 (±4,5)	1-1,9-3 (±0,5)
AM35	20-40,37-67,8 (±13)	14,6-28,24-43 (±7,8)	1,4	27,4-42,7-53,9 (±6,5)	1-2,1-3,1 (±0,5)
AM36	20,3-42,5-68 (±12,3)	14,5-29,8-42 (±7,8)	1,4	-	-
<b>PÍNUS</b>					
7	18,1-32-62,3 (±8,1)	13,1-34,1-39,7 (±5,5)	1,5	-	-
7 A	18,4-32,2-62,1 (±9,6)	13,7-23-39,8 (±5,9)	1,4	20-41,5-58,6 (±9,7)	1,3-2,7-4,7 (±0,8)
7 B	18,8-35,8-63,4 (±8,5)	13,1-24,2-39,4 (±5,6)	1,5	30,7-34-37,4 (±2,9)	1,8-2,7-3,2 (±0,6)
7 C	18-34,2-63,1 (±8,4)	13,7-23,6-39,5 (±5,7)	1,4	-	-
7	18,1-32-62,3 (±8,1)	13,1-34,1-39,7 (±5,5)	1,5	-	-
<b>CEDRINHO</b>					
Ced	24-33,65-48 (±4,9)	18-26,25-36 (±4,2)	1,3	33-36,4-45 (±3,6)	3

Legenda: <sup>A</sup> Limite inferior; <sup>B</sup> Média de 50 oósporos; <sup>C</sup> Limite superior; <sup>D</sup> Desvio-padrão. – estrutura não observada

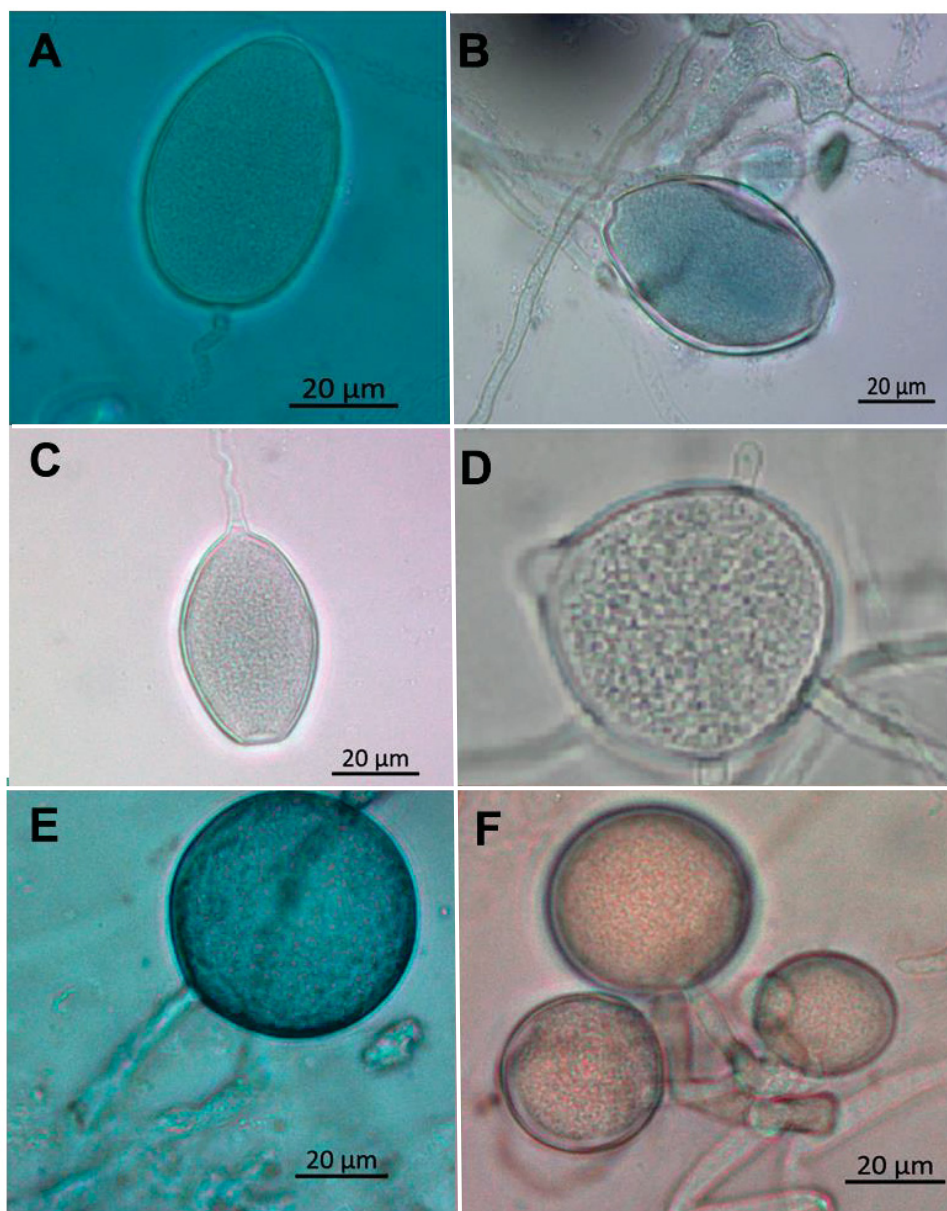
Os esporângios de erva mate apresentaram medidas de comprimento (C) x largura (L) variando de 18,9 x 12,88 até 69,13 x 44,35 µm, tendo em média 41,88 x 29,04 e uma razão C/L de em média 1,5 µm. Os isolados de araucária apresentaram esporângios variando de 20,17 x 14,3 até 69,9 x 42,2 µm, com média de 42,86 x 29,92 µm e razão C/L de em média 1,4 µm. Os isolados de pinus tiveram esporângios de em média 33,55 x 26,23 µm (18,3 x 13,41 – 62,7x 39,6 µm) e relação C/L de média 1,5 µm. O isolado de cedrinho apresentou esporângios papilados, persistentes, predominantemente ovóides, formados individualmente ou às vezes irregularmente simpodial. As medidas de comprimento e largura dos

esporângios variaram de 24 – 48 x 18 – 36  $\mu\text{m}$  (média de 33,65 x 26,23  $\mu\text{m}$ ), a relação C/L foi de 1,3, profundidade média da papila de 4,7  $\mu\text{m}$  e abertura do poro 5,7  $\mu\text{m}$ .

Os quatro isolados de erva mate, dois isolados de araucária e dois isolados de pinus apresentaram formação de estruturas de resistência, os clamidósporos. Nos isolados de erva mate estas estruturas tiveram em média 35,65  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1,8  $\mu\text{m}$  de espessura de parede, nos isolados de araucária 42  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 2  $\mu\text{m}$  de espessura de parede e nos isolados de pinus, 38,25  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 2,7  $\mu\text{m}$  de espessura de parede nessas estruturas. Para o isolado de cedrinho, os clamidósporos apresentaram-se intercalares com diâmetro variando de 45 – 33  $\mu\text{m}$  (média 36,35  $\mu\text{m}$ ) e espessura de média da parede de 3  $\mu\text{m}$ . A FIGURA 3 apresenta características dos esporângios e clamidósporos de *Phytophthora* dos hospedeiros em estudo.



FIGURA 3- CARACTERÍSTICAS DE ESPORÂNGIOS E CLAMIDÓSPOROS DE *Phytophthora* spp. SOB AUMENTO DE 400X. ESPORÂNGIOS ELIPSOIDES, PERSISTENTES E NÃO-PAPILADOS. A – AM35 (ARAUCÁRIA), B – 31B (ERVA-MATE), C – 7C (PÍNUS), D – CED (CEDRINHO); CLAMIDÓSPOROS TERMINAIS. C – 31A (ERVA-MATE), D – AM36 (ARAUCÁRIA).



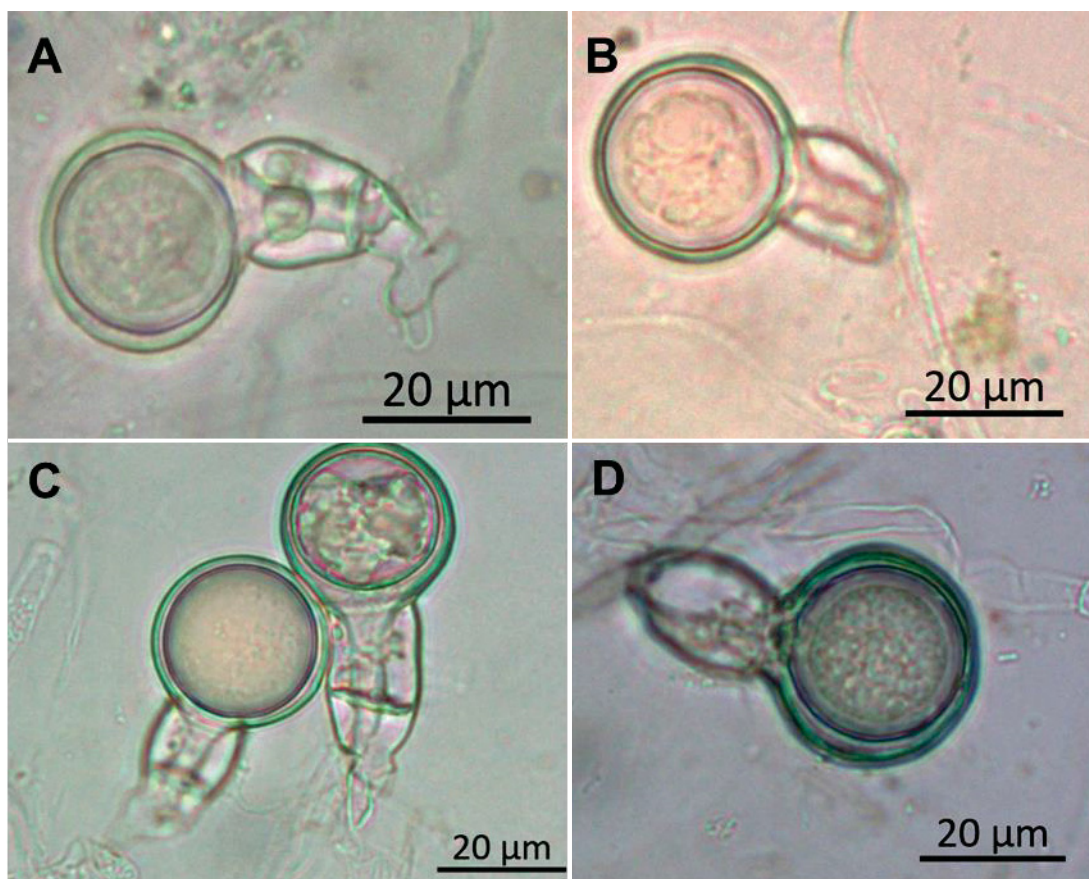
FONTE: O autor (2018).

#### 5.3.2.1 Avaliação das estruturas sexuais

Através dos pareamentos realizados neste trabalho, foi comprovada a natureza heterotática dos isolados de *Phytophthora* sp., de erva mate, araucária e pinus, com presença de apenas um dos grupos de compatibilidade (A2) (FIGURA 4). A formação de oósporos foi observada após dez dias de incubação no escuro, na linha de encontro das duas colônias dos isolados pareados. Não foram observadas

ornamentações nas paredes destas estruturas em nenhum dos isolados e todos apresentaram anterídios anfígenos.

FIGURA 4 - OÓSPOROS DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp.: OÓSPORO APLERÓTICO E ANTERÍDIO ANFÍGENO. (A: ISOLADO DE PINUS- 7A, B: ISOLADO DE ERVA MATE – 32A, C: ISOLADO DE PINUS – 7B, D: ISOLADO DE ARAUCÁRIA - AM34) AUMENTO 400X.



Fonte: O autor, 2018.

Os oósporos apresentaram-se globosos, appleróticos, com diâmetro de 19,85 – 28,23  $\mu\text{m}$  (média de 22,68  $\mu\text{m}$ ) para os isolados de erva mate, 18,9 – 37,2  $\mu\text{m}$  (média de 23,36  $\mu\text{m}$ ) para os isolados de araucária e 20,73 – 26,83  $\mu\text{m}$  (média de 23,13  $\mu\text{m}$ ) para os isolados de pínus (TABELA 3). O isolado de cedrinho foi classificado como pertencente ao grupo de compatibilidade A1. Os oósporos apresentaram-se globosos, appleróticos e não foram observadas ornamentações nas paredes, apresentando anterídio anfígeno.

TABELA 3 - GRUPO DE COMPATIBILIDADE, DIMENSÕES DO OOGÔNIO E OÓSPORO DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* spp. PAREADOS EM MEIO V8-ÁGAR.

ISOLADOS	DIÂMETRO (µm)	
	OÓSPORO	OOGÔNIO
AM31A	19,7 <sup>A</sup> -22,3 <sup>B</sup> -26,5 <sup>C</sup> (±2,1) <sup>D</sup>	23,6-26,6-30,8 (±2,1)
AM31B	19-22-26,1 (±1,9)	24-27,3-31,2 (±2)
AM32A	19,9-23,2-30,5 (±1,9)	23,4-27,6-36,3 (±0,5)
AM32B	20,7-23,2-27,1 (±1,5)	25,9-28,3-31,9 (±1,6)
AM34	19,5-23,8-28,2 (±1,7)	23,2-28,9-32,5 (±2)
AM35	18-23,5-27,7 (±1,5)	24-28,1-32,3 (±1,7)
AM36	19,2-22,7-25,2 (±1,5)	23-29,48-30,7 (±2,2)
7	22,3-23-26,5 (±1,6)	22,1-27,5-32,6 (±1,8)
7 A	20-22,7-26 (±1,2)	24,2-26,9-29,1 (±1,2)
7 B	20,6-23,9-28,1 (±1,8)	24,3-28,3-33,2 (±1,9)
7 C	20-22,9-26,7 (±1,6)	24,1-27,2-32,9 (±1,7)

Legenda: <sup>A</sup> Limite inferior; <sup>B</sup> Média de 50 oósporos; <sup>C</sup> Limite superior; <sup>D</sup> Desvio-padrão.

Os fragmentos das regiões 5.8S do rDNA amplificados dos isolados sequenciados de *Phytophthora* de erva mate, araucária, pinus e cedrinho apresentaram aproximadamente 600 pares de base para os primers ITS6/ITS4. A comparação das sequências da região ITS-5.8S do rDNA dos isolados deste estudo com sequências dessa região gênica disponíveis no Phytophthora-ID para espécies de *Phytophthora* revelou maior similaridade com a espécie *P. cinnamomi* para os isolados de erva mate, araucária e pinus e *P. nicotianae* para o isolado de cedrinho. Os índices de similaridade variaram de 98 a 99 % (TABELA 4).

TABELA 4 - SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE *Phytophthora* spp. DE ERVA MATE, ARAUCÁRIA, PINUS E CEDRINHO MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DE PORÇÕES E DAS REGIÕES ITS1, ITS2 E DO GENE COX DO DNA RIBOSSOMAL COM SEQUÊNCIAS DO *Phytophthora*-ID

Isolado	Similaridade (%)	Número de acesso no <i>Phytophthora</i> -ID
AM31A (erva mate)	99%	GU191212.1
AM35 (araucária)	99%	GU191212.1
7 (pinus)	99%	GU191212.1
Ced (cedrinho)	98%	AF266776

#### 5.4 DISCUSSÃO

Os isolados de *Phytophthora* de erva mate, araucária e da rizosfera de pinus foram identificados como *P. cinnamomi* e o isolado de cedrinho como *P. nicotianae*. Os isolados de *P. cinnamomi* caracterizaram-se por micélio de padrão rosáceo e cottonoso, hifas cenocíticas com presença de dilatações, formação de esporângios não papilados e persistentes. O isolado de *P. nicotianae* caracterizou-se por micélio cottonoso, hifa cenocítica, formação de esporângios papilados, persistentes, predominantemente ovóides, formados individualmente.

Os quatro isolados de erva mate apresentaram aspecto de colônia de padrão rosáceo enquanto os isolados de araucária, pinus e cedrinho apresentaram padrão cottonoso. O crescimento micelial foi similar em todos os isolados, não havendo crescimento a 8 e a 36 °C tendo como temperatura ótima em média 21 °C, para os isolados de erva mate e araucária. Zentmeyer (1987) relatou que as colônias de *P. cinnamomi* tem seu crescimento máximo entre os 24 a 27 °C e tem seu crescimento reduzido acima 33 °C e abaixo de 10 °C. Para o isolado de cedrinho houve crescimento a 8 °C e não houve crescimento micelial a 36 °C, tendo a ótima entre 28-32 °C. Para a espécie *P. nicotianae*, de acordo com Erwin e Ribeiro (1996,) a temperatura mínima de crescimento varia de 5 a 7 °C, a ótima é de 27 a 32 °C e a máxima é de 37 °C.

Nos isolados de erva mate, araucária e rizosfera de pinus observou-se a formação, em extrato de solo, de esporângios não papilados e predominantemente ovóides e elipsoides, sendo estes persistentes. As hifas, não septadas,



apresentaram dilatações nas hifas e também a formação de clamidósporos globosos. Estas características correspondem ao descrito para a espécie *Phytophthora cinnamomi* Rands (ERWIN; RIBEIRO 1996; GALLEGLY; HONG, 2008) e corroboram com as características definidas por Waterhouse (1963) para *Phytophthora cinnamomi*. Os esporângios de erva mate apresentaram medidas de comprimento (C) x largura (L) de em média 41,8 x 29 e uma razão C/L de em média 1,5  $\mu\text{m}$ . Os isolados de araucária apresentaram esporângios de em média 42,8 x 29,9  $\mu\text{m}$  e razão C/L de em média 1,4  $\mu\text{m}$ . Os isolados de pinus tiveram esporângios de em média 33,5 x 26,2  $\mu\text{m}$  e relação C/L de em média 1,5  $\mu\text{m}$ . As dimensões médias das estruturas dos isolados estão de acordo com os valores descritos por Rands (1922) e Waterhouse (1963), e com o encontrado por Santos (2014) que estudando isolados de *P. cinnamomi* no Brasil, oriundos de cultivos, encontrou dimensões semelhantes à deste estudo para os esporângios (39,5 X 24,6  $\mu\text{m}$ ).

O isolado de cedrinho apresentou esporângios papilados, persistentes, predominantemente ovóides, formados individualmente ou às vezes irregulares simpodial. As medidas de comprimento e largura dos esporângios foram em média de 33,6 x 26,2  $\mu\text{m}$ , profundidade média da papila de 4,7  $\mu\text{m}$  e abertura do poro 5,65  $\mu\text{m}$ . Na chave taxonômica, descrita por Stamps et al. (1990), o comprimento dos esporângios de *P. nicotianae* aparece entre 45-75  $\mu\text{m}$ . As dimensões dos esporângios têm se mostrado uma característica muito variável dentro da espécie. As características morfológicas da espécie de acordo com Erwin e Ribeiro (1996) são: esporângios papilados, persistentes apresentando várias formas como elipsoide, ovóide, piriforme, obpiriforme e esférico, medindo 11 a 60  $\mu\text{m}$  de comprimento e 20 a 45  $\mu\text{m}$  de largura, com relação C/L 1,1 a 1,7; esporângios papilados produzidos isoladamente ou em arranjo irregularmente simpodial. O isolado deste estudo possui características que corroboram com as descritas por este autor.

As estruturas de resistência, os clamidósporos, foram formadas nos quatro isolados de erva mate (média de 35,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1,8  $\mu\text{m}$  de espessura de parede), em dois isolados de araucária (42  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 2  $\mu\text{m}$  de espessura de parede) e em dois isolados de pinus (38,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 2,7  $\mu\text{m}$  de espessura de parede). Rands (1922) descreveu para os clamidósporos de *Phytophthora cinnamomi* diâmetros variando de 31 a 50  $\mu\text{m}$  (média 41  $\mu\text{m}$ ), podendo se apresentar terminais ou intercalares. Para o isolado de cedrinho os clamidósporos

apresentaram-se intercalares com diâmetro variando de 45 – 33  $\mu\text{m}$  (média 36,3  $\mu\text{m}$ ) e espessura de média da parede de 3  $\mu\text{m}$ . Segundo Erwin e Ribeiro (1996) esta espécie forma clamidósporos normalmente abundantes, podendo ser terminal ou intercalar e medindo de 13 a 60  $\mu\text{m}$  de diâmetro. De acordo com Stamps et al. (1990), as características dos clamidósporos podem ser usadas como um caráter taxonômico para diferenciar algumas espécies de *Phytophthora*. Entretanto, pela morfologia dos clamidósporos não variarem significativamente entre as espécies, a significância desta característica na taxonomia em grande parte fica limitada a sua presença ou ausência (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Os isolados de todos os hospedeiros caracterizados neste estudo apresentaram-se heterotáticos, com presença de apenas um dos grupos de compatibilidade (A2) para os isolados de erva mate, araucária e pinus. De acordo com Zentmyer (1987) para *P. cinnamomi*, o tipo A2 está amplamente distribuído, enquanto que o tipo A1 não é muito comum. O isolado de cedrinho foi classificado como pertencente ao grupo de compatibilidade A1. A formação de oósporos foi observada após dez dias de incubação no escuro, na linha de encontro das duas colônias dos isolados pareados. Não foram observadas ornamentações nas paredes destas estruturas em nenhum dos isolados e todos apresentaram anterídios anfígenos. Os oósporos dos isolados de erva mate, araucária e pinus se apresentaram globosos, apleróticos, com diâmetro de em média 22,6  $\mu\text{m}$  para os isolados de erva mate, média de 23,3  $\mu\text{m}$  para os isolados de araucária e média de 23,1  $\mu\text{m}$  para os isolados de pinus. Estes dados corroboram com Erwin e Ribeiro (1996), que descrevem para os oósporos diâmetro de 19 – 54  $\mu\text{m}$  e para o oogônio 21 - 58  $\mu\text{m}$ , sendo os oósporos estruturas formadas pelo pareamento de dois tipos de compatibilidade diferentes (A1 e A2).

Os dados do sequenciamento da região ITS demonstraram que os isolados de erva mate, araucária e pinus possuem similaridade com as sequências e *P. cinnamomi* depositadas no Phytophthora-ID. O isolado de cedrinho apresentou maior similaridade com as sequências de *P. nicotianae* depositadas no Phytophthora-ID. As sequências de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2 do gene ribossomal 5.8S do rDNA, bem como o próprio gene 5.8S do rDNA, têm sido utilizadas na taxonomia de *Phytophthora* visando um rápido diagnóstico (BERBEE; TAYLOR 1992), por apresentarem variação entre as espécies dentro de um gênero

(CHOWDAPPA et al., 2003). Outra vantagem é que esta região foi extensivamente sequenciada para a maioria das espécies de *Phytophthora* (COOKE et al., 2000).

No Brasil, já foi relatada a presença de *P. cinnamomi* causando doença em árvores adultas de araucária (SANTOS et al., 2011), no entanto, este é o primeiro relato deste patógeno causando doença em mudas desta planta. Existe também o relato de pinus (*Pinus patula*) como hospedeiro de *P. cinnamomi* no país (MENDES et al., 1998); no entanto, nenhum estudo conduzido caracterizando isolados, sendo este o primeiro estudo neste sentido. Este é também o primeiro relato da associação de *P. cinnamomi* com mudas de erva mate no mundo. É importante ressaltar que viveiros são ambientes geralmente quentes e úmidos, proporcionando um microclima favorável ao desenvolvimento de doenças, principalmente causadas por oomicetos.

Este é o primeiro relato de *P. nicotianae* causando doença em árvores de cedrinho no Brasil. O desenvolvimento de trabalhos que identifiquem e que caracterizem de forma completa, diferentes isolados que estejam ocorrendo são de suma importância, principalmente para *P. cinnamomi*, espécie ainda pouco estudada no país. Isso porque os relatos apenas inserem uma espécie de planta na lista de hospedeiros do patógeno, o estudo de caracterização e identificação permite um registro mais permanente sobre a ocorrência de determinada espécie em determinado hospedeiro e região, assim como suas características. Isso é essencial para que próximos estudos possam ser conduzidos com confiabilidade e possam ter base para comparações. Além disso, é possível ter o conhecimento da distribuição de uma espécie de patógeno e se esta espécie está ou não se dispersando para outras regiões, auxiliando no manejo das doenças e reduzindo as perdas e danos provocados pelo patógeno em diferentes culturas.



## 5.5 CONCLUSÕES

Os isolados de araucária, erva-mate e rizosfera de árvores de pinus foram identificados como *Phytophthora cinnamomi* Rands. Este é primeiro relato de *P. cinnamomi* causando morte de mudas de erva-mate e de mudas de araucária no mundo;

O isolado de cedrinho foi identificado como *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan.

## REFERÊNCIAS

- AKINSANMI, O.A.; NEAL, J.; DRENTH, A.; TOPP, B. Characterization of accessions and species of macadamia to stem infection by *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, v. 66, p. 186-193. 2017.
- ANAGNOSTAKIS, S. The effect of multiple importations of pests and pathogens on a native tree. **Biological Invasions**, v. 3, p. 245–254. 2001.
- ANDERSON, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: Mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n.7, p.547-556.2005.
- BALCI, Y.; BALCI, S.; EGGERS, J.; MACDONALD, W.L.; JUZWIK, J. *Phytophthora* species associated with forest soils in eastern and north-central U.S. oak ecosystems. **Plant Disease**, v. 91, p. 705–10. 2007.
- APPIAH, A.A.; FLOOD, J.; ARCHER, S.A.; BRIDGE, P.D. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. **Plant Pathology**, v. 53, n. 2, p. 209-219. 2004.
- BALCI, Y.; HALMSCHLAGER E. *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees. **Plant Pathology**, v. 52, p. 694–702. 2003.
- BALCI, Y.; HALMSCHLAGER, E. Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. **Forest Pathology**, v. 33, p. 157–174. 2003.
- BALCI, Y.; LONG, R.; MANSFIELD, M.; BALSER, D.; MACDONALD, W. Involvement of *Phytophthora* species in white oak (*Quercus alba*) decline in southern Ohio. **Forest Pathology**, v. 40, p. 430–442. 2010.
- BALDAUF, S. L.; PALMER, J. D. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11558-11562. 1993.
- BENSON, D. M.; GRAND, L. F. Incidence of *Phytophthora* root rot of Fraser Fir in North Carolina and sensitivity of isolates of *Phytophthora cinnamomi* to metalaxyl. **Plant Disease**, v. 84, p.661-664. 2000.
- BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. Two ascomycetes classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA sequence. **Molecular Biology Evolution**, v.9, p. 278-284. 1992.
- BESOAIN, X. et al. Efecto del Periodo de Inundación en el Desarrollo de la Tristeza del Palto (*Persea americana*), causada por *Phytophthora cinnamomi*. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 32, n. 2, p. 97-103, 2005.
- BLAIR, J. E.; COFFEY, M. D.; PARK, S.; GEISER, D. M.; KANG, S. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 266-277. 2008.

BRASIER, C.; ROBREDO, F.; FERRAZ, J. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. **Plant Pathology**, v. 42, p. 140–145. 1993.

BRASIER, C.M. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe: environmental constraints including climate change. **Annales des Sciences Forestieres**, v. 53, p. 347–358. 1996.

BRASIER, C.M.; KIRK, S.A.; DELCAN, J., et al. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens on Alnus trees. **Mycological Research**, v. 108, p. 1172–1184. 2004.

BRITT, J.; HANSEN, E. Phenotypic plasticity, fitness and multilocus genotypes of *Phytophthora ramorum* populations in southern Oregon tanoak forests. **Phytopathology**, v. 99, p.16. 2009.

BURGESS, T.I.; SCOTT, J.K.; MCDOUGALL, K.L.; STUKELY, M.J.; CRANE, C.; DUNSTAN, W.A.; BRIGG, F.; ANDJIC, V.; WHITE, D.; RUDMAN, T. Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. **Global Change Biology**, v. 23, p. 1661–1674. 2017.

BURGESS, T.I.; WEBSTER, J.L.; CIAMPINI, J.A.; WHITE, D.; HARDY, G.E.; STUKELY, M.J.C. Re-evaluation of *Phytophthora* species isolated during 30 years of vegetation health surveys in western Australia using molecular techniques. **Plant Disease**, v. 93, p. 215–23. 2009.

CAHILL, D.M.; ROOKES, J.E.; WILSON, B.A.; GIBSON, L.; MCDOUGALL, K.L. *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. **Australian Journal of Botany**, v. 56, p. 279–310. 2008.

CATEN, C.; JINKS, J. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, p. 329–348. 1968.

CHANG, S.; SHEPHERD, C.; PRATT, B. Control of sexuality in *Phytophthora cinnamomi*. **Australian Journal of Botany**, v. 22, p. 669–679. 1974.

CHANG, T.; YANG, W.; WANG, W. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 37, p. 165–171. 1996.

CHANG, Y.H.; YAN, H.Z.; LIOU, R.F. A novel elicitor protein from *Phytophthora parasitica* induces plant basal immunity and systemic acquired resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, p. 123–136. 2015.

CHOWDAPPA, P.; SHARMA, M.; DIKSHIT, A.; PANDEY, M.C.; BHAADARIA, S.; GOULD, J.C.; VABREUSEGBEN, R.; JAIN, N.; SHAHI, K.S.; ROXBURGH, A.C. Identification of *Phytophthora* species affecting plantation crops by RFLP of PCR-amplified internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. **Current Science**, v.85, n.1, p.34–36. 2003.

COOK, A. **Diseases of Tropical and Subtropical Fruits and Nuts**allyn, Hafner Press, New York. US. p. 332. 1975.

COOKE, D. E. L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J. M.; WAGELS, G.; BRASIER, C. M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 17-32. 2000.

COOKE, D.E.L; DUNCAN, J.M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. **Mycological Research**, v. 10, p. 667-677. 1997.

CRANDALL, B.S. Root disease of some conifers and hardwoods caused by *Phytophthora cambivora* (*P. cinnamomi*). **Plant Disease Reporter**, v. 20, p. 202-204, 1936.

CRANDALL, B.S., GRAVATT, G., RYAN, M.M. Root disease of *Castanea* species and some coniferous and broadleaf nursery stocks, caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 35, p.162–180. 1945.

CRANDALL, B.S.; GRAVATT, G.F. The distribution of *Phytophthora cinnamomi*. Part II—Geographical distribution. **Ceiba**, v.13, p. 57-78. 1967.

CROUS, P.W.; PHILLIPS, A.J.L.; BAXTER, A.P. **Phytopathogenic Fungi from South Africa**. Stellenbosch, South Africa, University of Stellenbosch, Department of Plant Pathology Press. 2000.

DAVISON, E.; TAY, F. The effect of waterlogging on infection of *Eucalyptus marginata* seedlings by *Phytophthora cinnamomi*. **New Phytologist**, v. 105, p. 585–594. 1987.

DAY, W., Root-rot of sweet chestnut and beech caused by species of *Phytophthora*: I. Cause and symptoms of disease: its relation to soil conditions. **Forestry**, v. 12, p. 101–116. 1938.

DELL, B.; MALAJCZUK, N. Jarrah dieback - A disease caused by *Phytophthora cinnamomi*. P. 67-87 in: **The Jarrah Forest: A Complex Mediterranean Ecosystem**. B. Dell, J.J. Havel, and N. Malajczuk, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 1989.

DELL, B.; MALAJCZUK, N. Jarrah dieback — A disease caused by *Phytophthora cinnamomi*. Pages 67-87 in **The Jarrah Forest: A Complex Mediterranean Ecosystem**. DELL, B.; HAVEL, J. J.; MALAJCZUK, N, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 1989.

DUDZINSKI, M. J.; OLD, K.M.; GIBBS, R.J. Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. **Australian Journal of Botany**, v. 41, p. 721-732. 1993.

DURÁN, A; GRYZENHOUT, M.; SLIPPERS, B.; AHUMADA, R.; ROTELLA, A.; FLORES, F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. **Plant Pathology**, v. 57, n. 4, p. 715-727. 2008.

EGGERS, J. E.; BALCI, Y.; MACDONALD, W. L. Variation among *Phytophthora cinnamomi* isolates from oak forest soils in the eastern United States. **Plant Disease**, v. 96, p.1608-1614. 2012.

ENGELBRECHT, J.; VAN DEN BERG, N. Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. **South African Journal of Science**, v. 109, p. 1–8. 2013.

ÉRSEK, T.; RIBEIRO, O. Mini review article: an annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 45, p. 251-266. 2010.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press. 1996. 562p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, vol.38, n.2, p. 109-112.

FREZZI; MARIANO, J. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, v.4, p. 47-133.1950.

GALINDO, J; ZENTMYER, G. A. Mating types in *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 54, p.9. 1964.

GALLEGLY, M. E.; HONG, C. *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2008.158 p. 2008.

GALLEGOS, T.; DIANA, E. **Identificación Molecular de *Phytophthora* spp. en el cultivo de Aguacate (*Persea americana* M.), de las principales zonas productoras del Ecuador**. Tesis, Facultad de Ingeniería Agronómica, 2013.

GOLDSTEIN, D. B.; LINARES, A. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. **Genetics**, v. 139, p. 463-471. 1995.

GREENE, M. D.; BENSON, M.; IVORS, K. L. Multilocus sequence analysis of *Phytophthora cinnamomi* from Fraser fir in North Carolina. **Phytopathology**, v. 96, p. 42. 2006.

GREENHALGH, F.C., CHALLEN, D.I. Trunk rot of oriental plane trees caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Australasian Plant Pathology**, v. 8,p. 50, 1979.

GUAJARDO, J.; SAA, S.; CAMPS, R.; BESOAIN, X. Outbreak of crown and root rot of walnut caused by *Phytophthora cinnamomi* in Chile. **Plant Disease**, v.10, p. 636-636. 2017.

HANSEN, E. M.; REESER, P. W.; SUTTON, W. *Phytophthora* beyond agriculture. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50(1), p. 359–378. 2012.

HANSEN, E.M. *Phytophthora* species emerging as pathogens of forest trees. **Current Forestry Reports**, v.1, p.16–24. 2015.

HANSEN, E.M.; BRASIER, C.M.; SHAW, D.S.; HAMM, P.B. The taxonomic structure of *Phytophthora megasperma*: evidence for emerging biological species groups. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 87, p. 557–73. 1986

HANSEN, E.M.; DELATOUR, C. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. **Ann. For. Sci.**, v. 56, p. 539–47. 1999.

HARDHAM, A. R. *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant Pathology**, v.6, p. 589–604. 2005.

HARDY, G.; SIVASITHAMPARAM, K. *Phytophthora* spp. associated with container grown plants in nurseries in Western Australia. **Plant Disease**, v. 72, p. 435–437. 1988.

HO, H. H.; ZENTMYER, G. A. Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. **Mycologia**, v. 69, p. 701 – 713. 1977.

HO, H.H. *Phytophthora cinnamomi* var. *Robiniae* var. *nova* on black locust in Jiangsu province of China. **Mycotaxon LXXXII**, p. 391–396. 2002.

HÜBERLI, D.; HARDY, G.E.; TOMMERUP, I.C. **Morphological and physiological characteristics of two *Phytophthora cinnamomi* populations**. In: Eleventh Biennial Conference of the Australian Plant Pathology Society: 307. Perth, WA. 1997.

HÜBERLI, D.; TOMMERUP, I.C.; DOBROWOLSKI, M.P.; CALVER, C.; HARDY, G.E. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. **Mycological Research**, v. 105, n. 9, p. 1053–1064. 2001.

HUSSON, C.; AGUAYO, J.; REVELLIN, C.; et al. Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora alni* supports taxonomic reclassification in this species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 77, p. 12–21. 2015.

HWANG, S.; KO, W. Biology of chlamydospores, sporangia, and zoospores of *Phytophthora cinnamomi* in soil. **Phytopathology**, v. 68, p. 726–731. 1978.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 424–429. 1996.

JONES, R. K.; BENSON, D. M. **Diseases of Woody Ornamentals and Trees in Nurseries**. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 2001.

JÖNSSON, U.; LUNDBERG, L.; SONESSON, K.; JUNG, T. First records of soilborne *Phytophthora* species in Swedish oak forests. **Forest Pathology**, v. 33, p. 175–79. 2003.

JUDELSON, H. S. Sexual reproduction in plant pathogenic Oomycetes: Biology and impact on disease. Pages 445–458 in: **Sex in Fungi**. J. Heitman, J. W. Kronstad, J. W. Taylor, and L. A. Casselton, eds. ASM Press, Washington D.C., USA. 2007.

JUNG, T.; BLASCHKE, H. *Phytophthora* root rot in declining forest trees. **Phyton (Austria)**, v. 36, p. 95–102. 1996.



JUNG, T.; BLASCHKE, H.; NEUMANN, P. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. **European Journal of Forest Pathology**, v.26, p. 253–72. 1996.

JUNG, T.; BLASCHKE, H.; OSSWALD, W. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. **Plant Pathology**, v. 49, p. 706–718. 2000.

JUNG, T.; BLASCHKE, M. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. **Plant Pathology**, v. 53, p. 197–208. 2004.

JUNG, T.; COLQUHOUN, I.J.; HARDY, G.E.S.J. New insights into the survival strategy of the invasive soil borne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. **Forest Pathology**, v. 43, p. 266-288. 2013.

JUNG, T.; HANSEN, E. M.; WINTON, L.; OBWALD, W.; DELATOUR, C. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. **Mycological Research**, v. 106, p. 397–411. 2002.

KAMOUN, S. *Phytophthora*. In: KRONSTAD, J. (Ed.) **Fungal pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.237-265. 2000.

KAMOUN, S.; FURZER, O.; JONES, J.D.G.; JUDELSON, H.S.; ALI, G.S.; DALIO, R.J.D.; ROY, S.G.; SCHENA, L.; ZAMBOUNIS, A.; PANABIÈRES, F.; CAHILL, D.; RUOCCO, M.; FIGUEIREDO, A.; CHEN, X.R.; HULVEY, J.; STAM, R.; LAMOUR, K.; GIJZEN, M.; TYLER, B.M.; GRÜNWARD, N.J.; MUKHTAR, M.S.; TOMÉ, D.F.A.; TÖR, M.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; MCDOWELL, J.; DAAYF, F.; FRY, W.E.; LINDQVIST-KREUZE, H.; MEIJER, H.J.G.; PETRE, B.; RISTAINO, J.; YOSHIDA, K.; BIRCH, P.R.J.; GOVERS, F. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.16, p. 413-434. 2015.

KLIEJUNAS, J.T.; KO, W. Association of *Phytophthora cinnamomi* with ohia decline on the island of Hawaii. **Phytopathology**, v. 66, p. 116–121. 1976a.

KLIEJUNAS, J.T.; KO, W. Dispersal of *Phytophthora cinnamomi* on the island of Hawaii. **Phytopathology**, v. 66, p. 457–460. 1976b.

KROON, L.; BAKKER, F. T.; VAN DEN BOSCH, G. B. M.; BONANTS, P. J.; FLIER, W. G. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 766-782. 2004.

KROON, L.P.N.M.; BROUWER H.; COCK, A.; GOVERS, F. The Genus *Phytophthora*. **Phytopathology**, v.102, p. 348-364. 2012.

LAN, C., RUAN, H., YAO, J. First Report of *Phytophthora cinnamomi* Causing Root and Stem Rot of Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in China. **Plant Disease**, v. 100, p. 2537. 2016a.



LAN, C.; RUAN, H.; YAO, J. First Report of *Phytophthora cinnamomi* Causing Root Rot of *Castanea mollissima* (Chinese Chestnut) in China. **Plant Disease**, v. 100, p. 1248-1248. 2016b.

LINDE, C.; DRENTH, A.; WINGFIELD, M. J. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p.667-680. 1999.

LIYANAGE, N. I. S.; WHEELER, B. E. J. Comparative morphology of *Phytophthora* species on rubber. **Plant Pathology**, v. 38, p.592-597. 1989.

LUZ, E. D. M. O gênero *Phytophthora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 80-81, 2006.

LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: Fungo Protista ou Chomista? In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F. dos; MATSUOKA, K. BEZERRA, J.L. (eds). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Campinas, Livraria Rural, p.1-22, 2001.

MAGALHÃES, D.M.A. **Diversidade de fungos na serapilheira e de *Phytophthora* na rizosfera de plantas da Mata Atlântica no Sul da Bahia**. Dissertação. 139 f. (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 2009.

MAMMELLA, M. A.; CACCIOLA, S. O.; MARTIN, F.; SCHENA, L. Genetic characterization of *Phytophthora nicotianae* by the analysis of polymorphic regions of the mitochondrial DNA. **Fungal Biology**, v. 115, p. 432-442. 2011.

MARKS, G.C.; SMITH, I.W. History, Distribution, Management and Control. Department of Conservation and Environment, Melbourne, Australia. **Lands and Forests Bulletin**, n. 31. 1991.

MARTIN, F. N.; COFFEY, M. D. Mitochondrial haplotype analysis for differentiation of isolates of *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 102, p.229-239. 2012.

MARTIN, F.N.; TOOLEY, P.W ; BLOMQUIST, C. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. **Phytopathology**, v. 94, p. 621-631. 2004.

MARTIN, F.N.; TOOLEY, P.W. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially-encoded cytochrome oxidase I and II genes. **Mycologia**, n.95, p.269-284. 2003.

MBAKA, J.N. **The ecology, distribution and population structure of *Phytophthora cinnamomi* associated with root rots and trunk cankers of macadamia in Kenya**. Dissertation. Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology. 2013.

MCCONNELL, M.; BALCI, Y. Fine root dynamics of oak saplings in response to *Phytophthora cinnamomi* infection under different temperatures and durations. **Forest Pathology**, v. 45, p.155–164. 2015.

- MCCONNELL, M.; BALCI, Y. *Phytophthora cinnamomi* as a contributor to white oak decline in mid-Atlantic United States forests. **Plant Disease**, v. 98, p. 319–327. 2014.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p. 349–379. 2002.
- MCKEEVER, K.; CHASTAGNER, G. A survey of *Phytophthora* spp. associated with Abies in US Christmas Tree Farms. **Plant Disease**, v.100, p.1161–1169. 2016.
- MENDES, M. A. S. et al. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa, 569 p. 1998.
- MOREIRA, A.; FERRAZ, J.; CLEGG, J. **The involvement of *Phytophthora cinnamomi* in cork and holm oak decline in Portugal**. In: First Int. Meeting on *Phytophthoras* in Forest and Wildland Ecosystems Grand Pass, OR, USA, p. 132–135. 1999.
- NEWHOOK, F.J.; PODGER, F.D. The role of *Phytophthora cinnamomi* in Australian and New Zealand forests. **Annual Review of Phytopathology**, v. 10, p. 299–326, 1972.
- NOWICKI, M.; FOOLAD, M. R.; NOWAKOWSKA, M.; KOZIK, E. U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. **Plant Disease**, v. 96, p.4–17. 2012.
- O'GARA, E.; HOWARD, K.; MCCOMB, J.; COLQUHOUN, I.J.; HARDY, G.E.S.J. Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, v. 64, p. 207–215. 2015.
- OLD, K. M.; MORAN, G. F.; BELL, J. C. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 2016–2022. 1984.
- OLD, K.; DUDZINSKI, M.; BELL, J. Isozyme variability in field populations of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. **Australian Journal of Botany**, v. 36, p.355–360. 1988.
- ONO, E.O.; DE BARROS S.A., RODRIGUES, J.D., et al. Enraizamento de estacas de *Platanus acerifolia*, tratadas com auxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 1373–1380. 1994.
- OUDEMANS, P.; COFFEY, M. D. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. **Mycological Research**, v. 95, p.1025–1046. 1991.
- PILOTTI; MASSIMO; et al. *Phytophthora cinnamomi* causing stem canker and root rot of nursery-grown *Platanus*× *acerifolia*: first report in the Northern hemisphere. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 1, p. 75. 2014.
- PLOETZ, R.C. *Phytophthora* root rot of Avocado. In *Phytophthora: A Global Perspective* (Lamour, K., ed.). p. 197–203. Wallingford, UK: CAB International. 2013.

PODGER, F.; DOEPEL, R.; ZENTMYER, G. Association of *Phytophthora cinnamomi* with a disease of *Eucalyptus marginata* forest in Western Australia. **Plant Disease Reporter**, v.49, p. 943–947. 1965.

PODGER, F.D.; NEWHOOK, F.J. *Phytophthora cinnamomi* in indigenous plant communities in New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v. 9, p. 625–638. 1971.

PRATT, B. H.; HEATHER, W. A.; SHEPHERD, C. J. Transcontinental occurrence of A1 and A2 strains of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 1099 -1100. 1972.

PRATT, B.H.; HEATHER W.A. The origin and distribution of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Australian native plant communities and the significance of its association with particular plant species. **Australian Journal of Biological Science**, v. 26, p. 559-573. 1973.

REEKSTING, B.J.; OLIVIER, N.A.; VANDENBERG, N. Transcriptome responses of an ungrafted *Phytophthora* root rot tolerant avocado (*Persea americana*) rootstock to flooding and *Phytophthora cinnamomi*. **BMC Plant Biology**, v. 16. 2016.

REEKSTING, B.J.; TAYLOR, N.; VANDENBERG, N. Flooding and *Phytophthora cinnamomi*: effects on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in shoots of non-grafted *Persea americana* (Mill.) rootstocks differing in tolerance to *Phytophthora* root rot. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 40–53. 2014.

REEVES, R.J. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* Rands in different soil and water regimes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 7, p.19-24. 1975.

REHDER, A. **Manual of cultivated trees and shrubs**, New York ed, v. 1, p. 558-578. 1927.

RIZZO, D.M.; GARBELOTTO, M.; DAVIDSON, J.M., et al. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densi florus* in California. **Plant Disease**, v. 86, p. 205–214. 2002.

ROBERT, V.; STEGEHUIS, G.; STALPERS, J. 2005. **The MycoBank engine and related databases**. Disponível em: < <http://www.mycobank.org>>. Acesso em janeiro de 2019.

ROBIN, C.; DESPREZ-LOUSTAU, M.-L. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p. 465–475. 1998.

ROBIN, C.; SMITH, I.; HANSEN, E. M. *Phytophthora cinnamomi*. **Forest Phytophthoras**, v. 2, n. 1. 2012.

RODRÍGUEZ-MOLINA, M.; BLANCO-SANTOS, A.; PALO-NÚÑEZ, E.; TORRES-VILA, L.; TORRES-ÁLVAREZ, E.; SUÁREZ-DE-LA-CÁMARA, M.; Seasonal and spatial mortality patterns of holm oak seedlings in: are forested soil infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Forest Pathology**, v. 35, p. 411–422. 2005.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; REIS, A. *Phytophthora* spp.: **Distribuição e Associação com Espécies Florestais**. In: Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 47.; simpósio brasileiro de mofo branco, 2014, Londrina. Desafios futuros: anais. Londrina: SBF. 2014.

SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; ALVES, T. C. A.; VIDA, J. B.; HARAKAVA, R. Root and Crown Rot of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Journal of Phytopathology**, v. 159, p. 194–196. 2011.

SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; ALVES, T. C. A.; VIDA, J. B.; HARAKAVA, R. Root and Crown Rot of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Journal of Phytopathology**, v. 159 p.194–196. 2011.

SANTOS, M. V. O. et al. *Phytophthora cinnamomi* na rizosfera de cultivos agrícolas no Sul da Bahia. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1. 2014.

SCANU, B., LINALDEDDU, B.T., FRANCESCHINI, A., ANSELMINI, N., VANNINI, A., VETTRAINO, A.M. Occurrence of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak forests in Italy. **Forest Pathology**, 43, 340–343. 2013.

SCHENA, L.; COOKE, D. E. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a "molecular tool box" for the detection and characterization of *Phytophthora* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 70-85. 2006.

SCHREIER, S. **Diversity among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from ornamental plants in South Carolina**. 167 f. Tese (Mestre em Ciências). 2013.

SCHUMANN, G. L.; D'ARCY, C. J. **Essential Plant Pathology**, Second Edition. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 2010.

SENA K.; CROCKER, E.; VINCELLI, P.; BARTON, C. *Phytophthora cinnamomi* as a driver of forest change: Implications for conservation and management. **Forest Ecology and Management**, v. 409, p.799-807. 2018.

SEPÚLVEDA-CHAVERA, GERMÁN, et al. Presence of *Phytophthora cinnamomi* Rands. In avocado orchards in Azapa and Codpa valleys, Chile. **IDESIA**, v. 3, n. 2, p. 41-47. 2013.

SERRAZINA, S.; SANTOS, C.; MACHADO, H.; PESQUITA, C.; VICENTINI, R.; PAIS, M.S.; SEBASTIANA, M.; COSTA, R. Castanea root transcriptome in response to *Phytophthora cinnamomi* challenge. **Tree Genetics and Genomes**, v. 11, p.1-19. 2015.

SGHAIER-HAMMAMI, B.; VALERO-GALVÁN, J.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M.C.; NAVARRO-CERRILLO, R.M.; ABDELLY, C.; JORRÍN-NOVO, J. Physiological and proteomics analyses of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) responses to *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 71, p.191-202. 2013.

SHEARER, B., SHEA, S., DEEGAN, P. Temperature-growth relationships of *Phytophthora cinnamomi* in the secondary phloem of roots of *Banksia grandis* and *Eucalyptus marginata*. **Phytopathology**, v. 77, p. 661–665. 1987.

SHEARER, B.L.; CRANE, C.E.; COCHRANE, A. Quantification of the susceptibility of the native flora of the south-west botanical province, Western Australia, to *Phytophthora cinnamomi*. **Australian Journal of Botany**, v. 52, p. 435-443. 2004.

SHEARER, B.L.; TIPPETT, J.T. **Jarrah dieback: The dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the jarrah (*Eucalyptus marginata*) forests of south-western Australia**. Perth, Department of Conservation and Land Management. 1989.

SHEPHERD, C. J.; PRATT, B. H. Temperature-growth relations and genetic diversity of A2 mating-type isolates of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. **Australian Journal of Botany**, v. 22, p. 231 - 249. 1974.

SHEPHERD, C. J.; PRATT, B. H.; TAYLOR, P. A. Comparative morphology and behavior of A1 and A2 isolates of *Phytophthora cinnamomi*. **Australian Journal of Botany**, v. 22, p. 461 - 470. 1974.

SHEPHERD, C.J. *Phytophthora cinnamomi*: An ancient immigrant to Australia. **Search**, v. 6, p. 484-490. 1975.

SMITH, A.L. **Biology of Chlamydospores of *Phytophthora ramorum***. 140 f. Dissertação (Mestre em Ciências, Botânica e Fitopatologia). Oregon State University, Oregon, 2007.

SOLANA, J.E.; SÁNCHEZ et al. Incidencia de la podredumbre radical causada por "*Phytophthora cinnamomi*" en masas de "Quercus" en Andalucía. **Boletín de Sanidad Vegetal**, v. 29, n. 1, p. 87-108, 2003.

STAMPS, D. J. et al. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. **Mycological Papers**, n. 162, p. 1-28. 1990.

TOOLEY, P. W.; MARTIN, F. N.; CARRAS, M. M.; Frederick, R. D. Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. **Phytopathology**, v. 96, p. 336-345. 2006.

TSAO, P.H. Why many *Phytophthora* root rots and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected. **Bulletin OEPP/EPPO**, v. 20, p. 11–17. 1990.

TZIROS, GEORGE T, DIAMANDIS, STEPHANOS. Identification of *Phytophthora cinnamomi* as the cause of decline and death in *Taxus baccata* in Greece. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 8, n. 1, p.153-155. 2013.

VETTRAINO, A.; BARZANTI, G.; BIANCO, M.; RAGAZZI, A.; CAPRETTI, P.; PAOLETTI, E.; LUISI, N.; ANSELMINI, N.; VANNINI, A. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. **Forest Pathology**, v. 32, p.19–28. 2002.



VETTRAINO, A.M.; NATILI, G.; ANSELMINI, N., et al. Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with resurgence of ink disease on *Castanea sativa* in Italy. **Plant Pathology**, v. 50, p. 90–96. 2001.

VILLA, N. O.; KAGEYAMA, K.; ASANO, T.; SUGA, H. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\beta$ tubulin gene sequences. **Mycologia**, v. 98, p. 410-422. 2006.

WATERHOUSE, G. M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. **Mycological Papers**, n. 92. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, United Kingdom. 1963.

WATERHOUSE, G. M.; NEWHOOK, F. J.; STAMPS, D. J. Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: **Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology** (eds. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao) American Phytopathological Society, Minnesota, USA, p. 139 - 147. 1983.

WESTE, G. The dieback cycle in Victorian forests: a 30-year study of changes caused by *Phytophthora cinnamomi* in Victorian open forests, woodlands and heathlands. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, p. 247-256. 2003.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: **PCR protocols: a guide to methods and applications**, (M. A. Inis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds.), San Diego. 1990.

WILLIAMSON, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535. 1990.

ZENTMYER, G. A. **The World of Phytophthora: Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology**, The American Phytopathological Society. 2. Minnesota. US. p. 17. 1987.

ZENTMYER, G. A.; LEARY, J. V.; KLURE, L. J.; GRANTHAM, G. L. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. **Phytopathology**, v. 66, p. 982 - 986. 1976

ZENTMYER, G.A. **Phytophthora cinnamomi and the diseases it causes**. St Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society. 1980.

ZENTMYER, G.A.; MENGE and H.D. OHR. *Phytophthora* root rot. In: Ploetz, R.C.; Zentmyer, G.A.; Nishijima, W.T.; Rohrbach, K.G.; H.D. Ohr. (Ed). **Compendium of Tropical Fruit Diseases**. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. p. 77-79. 1994.